

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16246

研究課題名（和文）Galectin-9を介したマンツル細胞リンパ腫のBCRシグナル活性化機序の解明

研究課題名（英文）Galectin-9 in mantle cell lymphoma

研究代表者

塚本 拓（Tsukamoto, Taku）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：50825049

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：マンツル細胞リンパ腫(MCL)において、Galectin-9(Gal-9)はB細胞受容体(BCR)シグナルの起点となる細胞膜脂質ラフトにBCR抑制性分子を局在化させることBCRシグナルを負の方向に制御し、細胞増殖を抑制することを明らかにした。MCLの腫瘍微小環境下においてGal-9の脱機能異常が生じ、BCRシグナル亢進による腫瘍形成が促進される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はMCLの腫瘍形成ならびにBCRシグナル過剰活性化の機序として、腫瘍微小環境に依存した糖鎖修飾ならびに関連分子であるGal-9の脱制御が関与することを示した画期的な研究と考えられる。MCL患者ではBCR標的治療抵抗性を示した場合、極めて予後不良であることが知られており、治療抵抗性克服は喫緊の課題であるもののBCRシグナル活性化機構にまだ不明な点が多いため、本研究成果がMCLの新規治療開発につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We uncovered Galectin-9 (Gal-9) interact with B cell receptor (BCR) inhibitory molecules to localize these glycoproteins on lipid raft of mantle cell lymphoma cells, resulting in inactivation of BCR signaling. Moreover, our results revealed that MCL microenvironment help tumors to dysregulate tumor suppressive Gal-9 function and Gal-9-associated glycosylation.

研究分野：血液内科学

キーワード：マンツル細胞リンパ腫 B細胞受容体シグナル Galectin-9 糖鎖修飾 腫瘍微小環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マンツル細胞リンパ腫(mantle cell lymphoma: MCL)は未だ完治困難な難治病型の悪性リンパ腫である。MCLの発生母地である胚中心前ナイーブB細胞では、生理的状態では抗原提示によって活性化するB細胞受容体(BCR)シグナルの活性は低い、逆にMCL細胞では恒常的に活性化しており、BCRシグナル構成分子であるBTKが疾患特異性高い標的となることからその阻害が治療効果を発揮する。多くのB細胞性リンパ腫では、*CD79A/CD79B*や*MYD88*、*CARD11*、*TNFAIP3*等のBCR-NF- κ Bシグナル経路を構成する様々な遺伝子に異常が高頻度に生じ、シグナル経路活性化の原因となるとされているが、MCLにおいてはこれらの遺伝子異常の頻度は低い。加えて、MCL細胞ではCD22やFCRIIB、PTPN6(SHP-1)、INPP5D(SHIP-1)といったBCRシグナル抑制因子が高発現している。

Galectinは糖鎖結合能を有するタンパク(レクチン)で、細胞内外からのシグナル伝達を修飾糖鎖との結合を介して調節し、細胞の生存や増殖を制御するとされる。近年、galectin-9 (Gal-9)がCD45をリガンドとしてCD22やSHP-1を介してBCRシグナルを抑制すること、正常Bリンパ球の各分化段階でGal-9発現や、Gal-9が認識する糖鎖構造が調節されていることが報告された。すなわち、糖鎖修飾がB細胞分化段階毎の特異的機能のスイッチであることが示唆されている。しかし、MCLをはじめとしたB細胞性リンパ腫においては、BCRシグナルへの関与を含め、Gal-9やGal-9との相互作用糖タンパク・糖鎖構造が腫瘍形成に関わるか検討された報告はこれまで存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、Gal-9の機能制御候補分子に関する包括的データを基盤にして、Gal-9を介したMCLの腫瘍特異的BCRシグナル活性化機序の解明を目指した。更にはGal-9機能制御分子の臨床的意義を明らかにするとともに、新規標的治療の可能性を探索することを目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

MCL細胞株を用いた*in vitro*の系においてリコンビナントGal-9を用いた細胞増殖・細胞死の検証や、BCRシグナルに対する影響をCa²⁺細胞内流入アッセイやウェスタンブロット等を用いて検討を行った。臨床検体におけるGal-9のBCRシグナルに対する影響に関しては、公開されているMCL腫瘍検体のマイクロアレイデータ(Gene Expression Omnibus #GSE93291)を用いて、Gal-9・Gal-9関連分子とBCR signature genesとの発現比較によって検討した。

Gal-9機能制御分子の同定は共免疫沈降法によって検証した。

Gal-9の腫瘍特異的脱制御機構の要因として、腫瘍微小環境の影響が考えられたため、*in vitro*腫瘍微小環境モデルとして、間葉系細胞とMCL細胞の共培養実験およびSDF-1/CXCR4の関与を検討するためのCXCR4阻害薬(prelixator)を利用した。

Gal-9相互作用分子の機能解析においては、主として蛍光免疫染色を用いた各分子の局在解析を行った。

Gal-9認識糖鎖の修飾機構に関して、糖鎖修飾酵素の定量的PCR法や、糖鎖特異的認識レクチンを用いたフローサイトメトリー法を利用した。

4. 研究成果

MCL細胞株はGal-9濃度依存的に細胞増殖が抑制されただけでなく(図1)、濃度依存的にBCRシグナルを抑制的に制御することが明らかになった(図2)。また、臨床検体のマイクロアレイデータにおいてもGal-9発現とBCRシグナルは負の相関関係を示した(図3)。

Gal-9との相互作用分子を網羅的に解析すべく、フローサイトメトリーによる細胞選択やgenome-wide CRISPRライブラリーシステムを用いた解析を目指したが、フローサイトメトリーによる細胞選択が十分に機能しないことが判明し、本解析は断念した。BCRシグナルを抑制的に制御する既知分子に着目したところ、複数の分子がGal-9との結合能を有することが明らかとなった。これらの分子は、高濃度Gal-9存在下においてはBCRシグナルのシグナル起点と

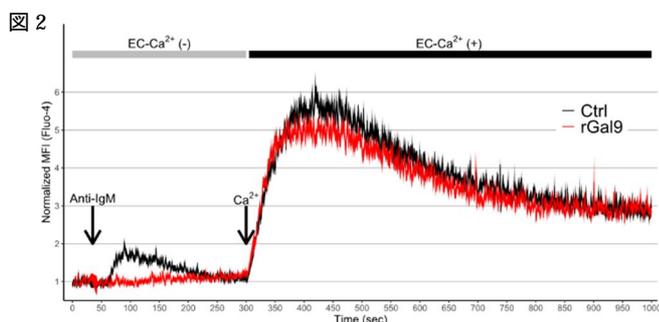
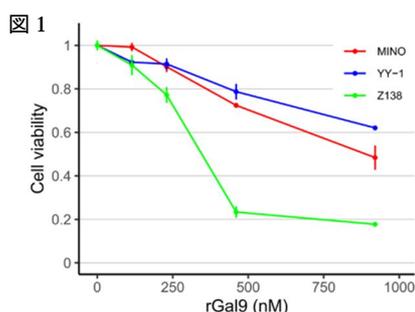


図 3

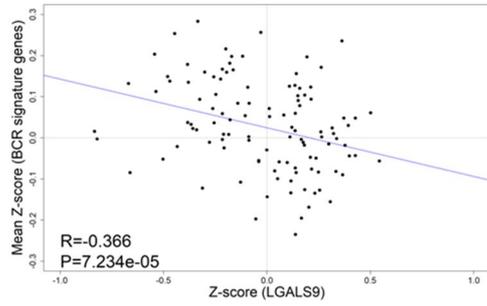
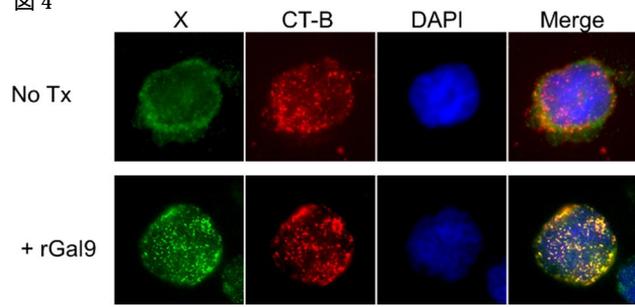


図 4



なる脂質ラフトへの局在化が強化されることが明らかとなり(図 4)、Gal-9 の BCR シグナル抑制化の一因と考えられた。

Gal-9 は腫瘍抑制的に機能することが示唆されたため、腫瘍特異的な Gal-9 の脱制御機構の存在を検証した。MCL は間葉系細胞をはじめとした腫瘍微小環境構成細胞との相互作用によって生存・増殖が維持されると考えられているが、間葉系細胞との共培養を行う *in vitro* の系において、MCL 細胞は SDF-1/CXCR4 依存的に BCR シグナルが亢進するだけでなく、共培養において Gal-9 との相互作用に抑制的に関与する糖鎖修飾酵素の一群の発現が誘導されることが明らかとなった(図 5-6)。すなわち、MCL は腫瘍微小環境という特異的環境下において Gal-9 の機能異常が生じ、BCR シグナル亢進による腫瘍形成が促進される可能性が示唆された。

図 5

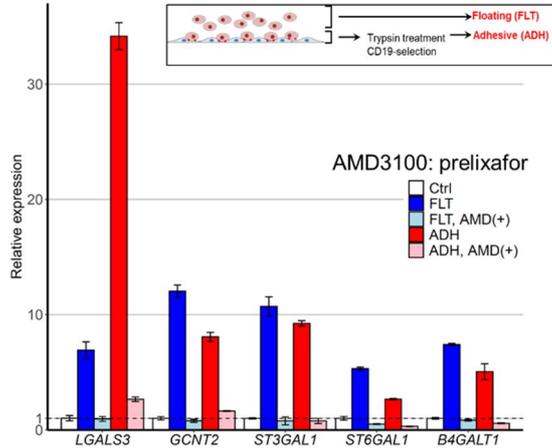
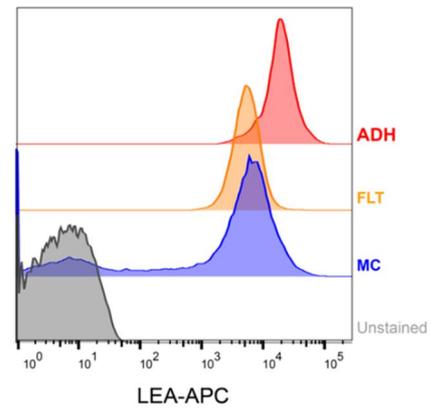


図 6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tsukamoto Taku, Tokuda Yuichi, Nakano Masakazu, Tashiro Kei, Kuroda Junya	4. 巻 6
2. 論文標題 Expression of activated B-cell gene signature is predictive of the outcome of follicular lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1932 ~ 1936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021005876	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Muramatsu A, Kobayashi T, Kawaji-Kanayama T, Uchiyama H, Sasaki N, Uoshima N, Nakao M, Takahashi R, Shimura K, Kaneko H, Kiyota M, Wada K, Chinen Y, Hirakawa K, Fuchida S, Shimazaki C, Mizutani S, Tsukamoto T, Shimura Y, Taniwaki M, Teramukai S, Kuroda J	4. 巻 63
2. 論文標題 Pretreatment serum level of interleukin-6 predicts carfilzomib-induced hypertension in relapsed/refractory multiple myeloma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia & Lymphoma	6. 最初と最後の頁 1678 ~ 1685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2022.2038373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Isa Reiko, Horinaka Mano, Tsukamoto Taku, Mizuhara Kentaro, Fujibayashi Yuto, Taminishi-Katsuragawa Yoko, Okamoto Haruya, Yasuda Shusuke, Kawaji-Kanayama Yuka, Matsumura-Kimoto Yayoi, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Taniwaki Masafumi, Sakai Toshiyuki, Kuroda Junya	4. 巻 23
2. 論文標題 The Rationale for the Dual-Targeting Therapy for RSK2 and AKT in Multiple Myeloma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2919 ~ 2919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23062919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ri Masaki, Suzuki Kenshi, Ishida Tadao, Kuroda Junya, Tsukamoto Taku, Teshima Takanori, Goto Hideki, Jackson Carolyn C., Sun Huabin, Pacaud Lida, Fujikawa Ei, Yeh Tzu Min, Hatayama Tomoyoshi, Aida Kensuke, Sunagawa Yoshihiro, Iida Shinsuke	4. 巻 113
2. 論文標題 Ciltacabtagene autoleucl in patients with relapsed/refractory multiple myeloma: <scp>CARTITUDE</scp> 1 (phase 2) Japanese cohort	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4267 ~ 4276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuhara Kentaro, Kobayashi Tsutomu, Nakao Mitsushige, Takahashi Ryoichi, Kaneko Hiroto, Shimura Kazuho, Hirakawa Koichi, Uoshima Nobuhiko, Wada Katsuya, Kawata Eri, Isa Reiko, Fujino Takahiro, Tsukamoto Taku, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Yoneda Akiko, Watanabe Akihide, Sotozono Chie, Kuroda Junya	4. 巻 12
2. 論文標題 Watchful waiting is an acceptable treatment option for asymptomatic primary ocular adnexal mucosa associated lymphoid tissue lymphoma: A retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3134 ~ 3144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Haruya, Uoshima Nobuhiko, Muramatsu Ayako, Isa Reiko, Fujino Takahiro, Matsumura-Kimoto Yayoi, Tsukamoto Taku, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Kobayashi Tsutomu, Kawata Eri, Uchiyama Hitoji, Kuroda Junya, Kyoto Clinical Hematology Study Group Investigators	4. 巻 11
2. 論文標題 Combination of Bone Marrow Biopsy and Flow Cytometric Analysis: The Prognostically Relevant Central Approach for Detecting Bone Marrow Invasion in Diffuse Large B-Cell Lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1724 ~ 1724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics11091724	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagata Hiroaki, Kuriyama Kodai, Nishikawa Rina, Ohshiro Muneo, Yamamoto-Sugitani Mio, Fujimoto-Hirakawa Yoshiko, Matsumoto Yosuke, Iwai Toshiki, Tsukamoto Taku, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Kobayashi Tsutomu, Fukuda Wataru, Uchiyama Hitoji, Kuroda Junya	4. 巻 100
2. 論文標題 Iguratimod triggers the relapse of methotrexate-associated lymphoproliferative disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 2849 ~ 2850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-021-04645-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsuragawa Taminishi Yoko, Mizutani Shinsuke, Kawaji Kanayama Yuka, Onishi Akio, Okamoto Haruya, Isa Reiko, Mizuhara Kentaro, Muramatsu Ayako, Fujino Takahiro, Tsukamoto Taku, Shimura Yuji, Taniwaki Masafumi, Miyagawa Hayashino Aya, Konishi Eiichi, Kuroda Junya	4. 巻 114
2. 論文標題 Triple targeting of RSK, AKT, and S6K as pivotal downstream effectors of PDPK1 by TAS0612 in B cell lymphomas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4691 ~ 4705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizuhara Kentaro, Shimura Yuji, Tsukamoto Taku, Kanai Akinori, Kuwahara Ota Saeko, Yamaguchi Junko, Muramatsu Ayako, Okamoto Haruya, Taminishi Katsuragawa Yoko, Kawaji Kanayama Yuka, Isa Reiko, Mizutani Shinsuke, Inaba Toshiya, Kuroda Junya	4. 巻 203
2. 論文標題 Tumour derived exosomes promote the induction of monocytic myeloid derived suppressor cells from peripheral blood mononuclear cells by delivering <sc>miR</sc> 106a 5p and <sc>miR</sc> 146a 5p in multiple myeloma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 426 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.19049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawaji Kanayama Yuka, Tsukamoto Taku, Nakano Masakazu, Tokuda Yuichi, Nagata Hiroaki, Mizuhara Kentaro, Katsuragawa Taminishi Yoko, Isa Reiko, Fujino Takahiro, Matsumura Kimoto Yayoi, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Taniwaki Masafumi, Tashiro Kei, Kuroda Junya	4. 巻 115
2. 論文標題 miR 17 92 cluster BTG2 axis regulates B cell receptor signaling in mantle cell lymphoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 452 ~ 464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.16027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Haruya, Inoue Yu, Miyashita Akihiro, Kawaji-Kanayama Yuka, Chinen Shotaro, Fujino Takahiro, Tsukamoto Taku, Shimura Yuji, Mizutani Shinsuke, Kaneko Hiroto, Kuwahara-Ota Saeko, Fuchida Shin-ichi, Nishiyama Daichi, Hirakawa Koichi, Uchiyama Hitoji, Uoshima Nobuhiko, Kawata Eri, Kuroda Junya, KOTOSG investigators	4. 巻 118
2. 論文標題 Real-world practice-based prognostic model for higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine monotherapy: The Kyoto prognostic scoring system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 323 ~ 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-023-03627-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto Taku, Kinoshita Masaki, Yamada Kazuhiro, Ito Hodaka, Yamaguchi Toshikazu, Chinen Yoshiaki, Mizutani Shinsuke, Fujino Takahiro, Kobayashi Tsutomu, Shimura Yuji, Inazawa Johji, Kuroda Junya	4. 巻 68
2. 論文標題 Imaging flow cytometry-based multiplex FISH for three IGH translocations in multiple myeloma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 507 ~ 514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-023-01136-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------