

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253069

研究課題名(和文) 悪性幹細胞を標的とするヒト慢性骨髄性腫瘍制御法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the myeloid leukemic stem cell-targeted therapy

研究代表者

赤司 浩一 (Akashi, Koichi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80380385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト癌幹細胞を標的とする新世代の癌治療法は、AMLにおいてその実用化が目前である。一方で、高齢者造血器疾患の多くは慢性骨髄性疾患であり、その多くは難治性急性白血病に移行するが、その幹細胞は未だ同定されていない。本研究課題では、慢性骨髄性疾患を含む骨髄系造血器腫瘍に共通の悪性幹細胞のクローン進化機構としてTIM-3陽性悪性幹細胞が、TIM-3リガンドであるgalectin-9を自ら分泌し、恒常的なTIM-3シグナルを生じるオートクライン機構を同定した。さらに、高効率にヒト正常および悪性造血を再構築可能な新規免疫不全マウスBRGSマウス、およびその発展型のBRGSKマウスラインの樹立に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have identified common machinery for the development and maintenance of myeloid leukemic stem cells; TIM-3/galectin-9 autocrine loop. CD34+CD38-TIM-3+ myeloid leukemic stem cells produce and secrete galectin-9, TIM-3 ligand in an autocrine manner, leading to the constitutive activation of TIM-3 signaling. TIM-3 signaling promotes self-renewal capacity of the malignant stem cells via co-activation of NF- $\kappa$ B and beta-catenin pathways. Thus, signaling molecules downstream of TIM-3 and galectin-9 ligation, as well as surface TIM-3 itself might be good candidates for cancer stem cell-target therapy common to most myeloid malignancies. In addition to the identification of TIM-3/galectin-9 autocrine loop, we established the novel immunodeficient mice lines; BRGS and BRGSK mice. Human normal and malignant hematopoiesis could be efficiently reconstituted in the novel immunodeficient mice.

研究分野：血液内科学

キーワード：がん幹細胞 白血病幹細胞 免疫不全マウス TIM-3

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織は、自己再生能力を持つ一部の腫瘍性幹細胞を起源とする。ヒト悪性腫瘍においては、重症免疫不全マウスの開発と細胞純化技術の進歩により、マウスへの異種移植後にヒト急性骨髄性白血病(AML)を再構築できるヒト白血病幹細胞(LSC)が同定された。この腫瘍性幹細胞を有効に死滅させることが出来れば、理論的には癌の根治が得られる。我々は、AML 幹細胞特異的抗原としてTIM-3 を抽出し、これを標的とした in vivo 治療法を開発中である (Kikushige et al., Cell Stem Cell 7, 2010)。AML における白血病幹細胞が同定された一方で、その前白血病状態とも言える慢性骨髄性疾患である骨髄増殖性腫瘍(Myeloproliferative neoplasms: MPN)や慢性骨髄性白血病(CML)、骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndromes: MDS)の幹細胞は、多くの研究者の精力的研究にも関わらず未だ同定されていない。本研究において、MPN や MDS を生体内で再構築可能な腫瘍性幹細胞を同定する。さらにこの腫瘍性幹細胞の特異的抗原やその維持機構を明らかにする。

2. 研究の目的

ヒト癌幹細胞を標的とする新世代の癌治療法は、AML においてその実用化が目前である。一方で、高齢者造血器疾患の多くは慢性骨髄性疾患 (骨髄増殖性腫瘍および骨髄異形成症候群) であり、その多くは難治性急性白血病に移行するが、その幹細胞は未だ同定されていない。本計画では、慢性骨髄性疾患の各病期における腫瘍性幹細胞の分離技術を確認し、新規開発した次世代免疫不全マウスに異種移植しこれらの疾患を再構築する。さらに慢性期腫瘍幹細胞と急性期腫瘍幹細胞の生物学的特性の差を明らかにし、白血病への移行を遮断する新規治療法開発基盤を確立することを本研究課題の目的とする。

3. 研究の方法

本研究の目的達成のために、我々は以下の2つの研究プロジェクトを同時に遂行した。  
**(A) 白血病幹細胞抗原 TIM-3 の機能解明および、慢性骨髄性疾患における白血病幹細胞の同定**  
**(B) 新規免疫不全マウスの樹立による in vivo アッセイ系の改善**

4. 研究成果

**(A) 白血病幹細胞抗原 TIM-3 の機能解明および、慢性骨髄性疾患における白血病幹細胞の同定**

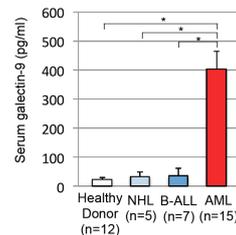
**1) AML 細胞および LSCs 自身が TIM-3 リガンドである galectin-9 を高発現し、分泌する**

我々は、まず造血器腫瘍患者の血清中のTIM-3 ligand である galectin-9 の濃度をELISA法にて測定した。図1に示すようにAML症例で galectin-9 の血中濃度が上昇している

ことを見いだした。

図1 血清galectin-9濃度はAML症例で上昇している

Serum human Gal-9 was measured by ELISA



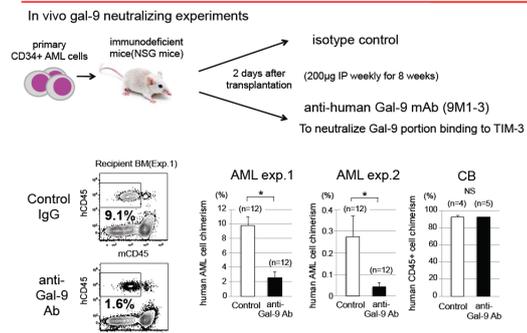
血清galectin-9はAML症例で特異的に上昇している

そこでTIM-3 陽性のAML 細胞自身がligand である galectin-9 を分泌する仮説をたてた。そこで、細胞質内 FACS を行い、CD34+AML 細胞において galectin-9 の高発現を確認した。次に我々は、AML 細胞を免疫不全マウスに異種移植を行い、ヒト AML を再構築したレシピエントマウス内でのヒト galectin-9 血清濃度を測定したところ、AML 細胞を再構築したレシピエントマウスではヒト galectin-9 濃度が患者血清中と同様に上昇していたが、臍帯血やB細胞性急性リンパ球性白血病を移植したマウスの血清中からはヒト galectin-9 はほとんど検出されなかった。すなわち、AML および LSC がマウス内で TIM-3 ligand である galectin-9 を autocrine 様式で分泌して、自身の発現する TIM-3 を刺激することで、恒常的なTIM-3 シグナルがAML/LSCにおいて生じていることを見いだした。

**2) TIM-3/galectin-9 相互作用は LSC の機能を正に制御している**

上述のように、我々は in vivo において LSC が TIM-3 を発現するとともに galectin-9 を分泌する autocrine signal の存在を明らかにした。次に、TIM-3/galectin-9 autocrine シグナルが LSC の機能にどのように影響を与えているかを明らかにするために in vivo における galectin-9 中和実験を行った。免疫不全マウスにヒト AML 細胞を移植2日後よりヒト galectin-9 とヒト TIM-3 の結合阻害活性を有する抗ヒト galectin-9 抗体(9M1-3)をマウスに投与開始して、8週間後にヒト AML の再構築能力を評価した。図2に示すように

図2 TIM-3/galectin-9 autocrine機構はLSCsの腫瘍再構築能力に重要な役割を果たす



中和抗体を投与した群では、AML の再構築が

抑制された。すなわち、TIM-3/galectin-9 autocrine 刺激系が LSC の機能を正に制御していることが示された。

### 3) TIM-3 シグナルは NF- $\kappa$ B と $\beta$ -catenin の共活性化を生じる

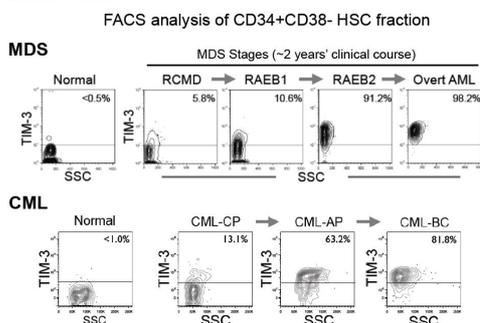
次に TIM-3 シグナル下流でどのような分子が LSC の機能制御に寄与するかを明らかにするために、ヒト AML 細胞を galectin-9 で刺激し、マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現の変化を解析した。有意に発現が変化した遺伝子群を抽出し、pathway enrichment 解析を行い、どのような signal pathway に関連する遺伝子が TIM-3 刺激により変化したかを検証したところ、NF- $\kappa$ B 関連 signal pathway と  $\beta$ -catenin 関連 signal pathway が有意に enrich されることが明らかになった。TIM-3 陽性 AML 細胞を galectin-9 で刺激すると AKT や ERK のリン酸化亢進とともに NF- $\kappa$ B p65 のリン酸化が亢進することを確認した。さらに、 $\beta$ -catenin の活性化についても、Array Scan System(Thermo)を用いることで、 $\beta$ -catenin タンパク質の核内以降が TIM-3 刺激により促進されることを確認した。即ち、TIM-3/galectin-9 autocrine 刺激系は TIM-3 を発現する LSC において NF- $\kappa$ B と  $\beta$ -catenin の共活性化を生じることを明らかにした。

### 4) TIM-3/galectin-9 autocrine 刺激系は、AML 以外の骨髄系腫瘍においても普遍的に LSC のクローン優位性獲得のために利用されている。

上述の研究結果から、TIM-3 陽性 LSC は AML 細胞自身が産生、分泌する galectin-9 による恒常的なシグナルが生じていること、そしてその TIM-3 シグナルは NF- $\kappa$ B と  $\beta$ -catenin 経路の共活性化を誘導し、LSC 活性を正に制御していることが明らかになった。

次に我々は、AML 以外の骨髄性腫瘍において同様の TIM-3/galectin-9 autocrine 刺激系が機能している可能性について検討した。図 3 に示すように我々は、MDS あるいは CML 症例の CD34+CD38-造血幹細胞分画において、LSC 様の表面形質を示す TIM-3 陽性異常幹細胞集団が病期進展とともに増加していくことを見いだした。すなわち、AML 以外の他の骨髄系腫瘍においても病初期から 2 次性 AML

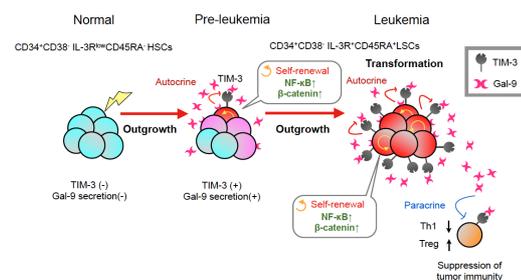
図3 慢性骨髄性疾患における病期進展に伴うTIM-3+ LSC cloneの増大



へと進展する過程でも同様に TIM-3 陽性 LSC 様異常造血幹細胞の増加を認めた。

さらに、これらの骨髄性腫瘍においては TIM-3 リガンドである galectin-9 の血中濃度が病初期の段階から上昇していることを確認した。すなわち、AML 同様に恒常的な TIM-3 シグナルが存在し、その結果として TIM-3 陽性異常幹細胞のクローン拡大が生じている可能性が考えられた (図 4)。

図4 TIM-3/Gal-9 autocrine stimulatory loopはLSCsのclonal dominancy獲得の過程で重要な役割を担う



このように TIM-3/galectin-9 autocrine システムは、ヒト骨髄系腫瘍において TIM-3+LSC のクローン優勢獲得のために普遍的に用いられているシステムであると考えられた。今後は、この TIM-3 シグナルの下流分子をより詳細に明らかにすることで骨髄系腫瘍に共通の白血病幹細胞を標的とした新規治療標的分子の同定につながるよう研究を進めていく方針である。本研究内容は 2015 年の Cell Stem Cell 誌に掲載された (Kikushige et al., Cell Stem Cell 2015)。

### (B) 新規免疫不全マウスの開発

#### 1) B6 バックグラウンドの高度免疫不全マウス BRGS マウスの樹立

我々は本研究課題遂行のための基盤技術として、次世代ヒト骨髄系腫瘍幹細胞アッセイシステム構築を行った。代表的な免疫不全マウスである NOD ラインは異種移植効率が良いが、その原因が SIRPA 遺伝子における NOD 特有の多型にあること、すなわちマウスマクロファージ上の NOD 型 SIRPA がヒト幹細胞上の CD47 と効率よく結合することにより、貪食による拒絶が抑制されていることを報告した (Nat Immunol 8, 2007)。そこで、NOD 型の SIRPA を B6 バックグラウンドマウスにノックインした BRGS マウスラインを樹立し、2013 年の Blood 誌に報告した (Yamauchi et al., Blood 2013)。BRGS マウスは B6 バックグラウンドでありながら、従来 NOD バックグラウンドマウスと同等のヒト造血幹細胞支持能力を有していた。我々は、BRGS マウスの樹立により、NOD 型マウスのヒト造血幹細胞支持能力が SIRPA 分子の多型という単一遺伝子の機能変化によることを証明した。さらに、別ストレインである BALB/c マウスの SIRPA 遺伝子多型も、マウスマクロファージのヒト造血幹細胞支持能力に寄与することも明らかにした (Iwamoto et al., Exp

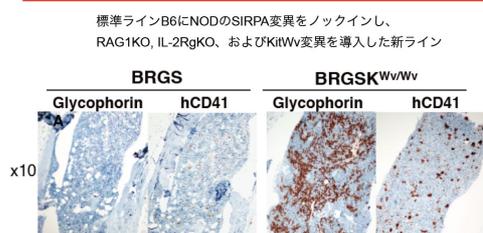
Hematology 2014)。

## 2)BRGS マウスを基盤とした新規高度免疫不全マウス BRGSK マウスの樹立

我々は、BRGS マウスの樹立により、NOD 型マウスのヒト造血幹細胞指示能力が SIRPA の多型によることを証明した。さらに BRGS マウスによるヒト造血幹細胞支持能力および白血病幹細胞支持能力を強化するために、BRGS マウスにマウス KIT 遺伝子の機能欠失型 KIT<sup>Wv/Wv</sup> 変異を導入した BRGSK マウスラインを樹立した。図 5 に示すように BRGSK マウス

図5

新規免疫不全マウスBRGSKマウスの樹立



ヒト細胞キメラの飛躍的上昇に加え、赤芽球系、巨核球系細胞を含むヒト骨髄系細胞の生着効率が飛躍的に改善

では BRGS マウスと比較して、これまで困難であったヒト赤芽球系細胞、巨核球系細胞の高効率の生着が可能になった(Yurino et al., submitted)。

## 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 14 件)

1. Kikushige Y, Miyamoto T. Identification of TIM-3 as a Leukemic Stem Cell Surface Molecule in Primary Acute Myeloid Leukemia. *Oncology* 89 Suppl 1: 28-32, 2015
2. Kikushige Y, Miyamoto T, Yuda J, Tabrizi S-J, Shima T, Takayanagi S, Niino H, Yurino A., Miyawaki K, Takenaka K, Iwasaki H, Akashi K. A TIM-3/Gal-9 autocrine stimulatory loop drives self-renewal of human myeloid leukemia stem cells and leukemic progression, *Cell Stem Cell*: 17, 341-52, 2015
3. Kikushige Y and Miyamoto T. Pre-malignant lymphoid cells arise from hematopoietic stem/progenitor cells in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Hematol*, 2015
4. Izumi K, Mine K, Inoue Y, Teshima M, Ogawa S, Kai Y, Kurafuji T, Hirakawa K, Miyakawa D, Ikeda H, Inada A, Hara M, Yamada H, Akashi K, Niho Y, Ina K, Kobayashi T, Yoshikai Y, Anzai K, Yamashita T, Minagawa H, Fujimoto S, Kurisaki H, Shimoda K, Katsuta H, Nagafuchi S. Reduced Tyk2 gene expression in -cells due to natural mutation determines susceptibility to virus-induced diabetes. *Nat Commun* 6: 6748,

2015

5. Ayano M, Tsukamoto H, Kohno K, Ueda N, Tanaka A, Mitoma H, Akahoshi M, Arinobu Y, Niino H, Horiuchi T, Akashi K. Increased CD226 Expression on CD8+ T Cells Is Associated with Upregulated Cytokine Production and Endothelial Cell Injury in Patients with Systemic Sclerosis. *J Immunol* 195: 892-900, 2015
6. Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, Arakawa F, Ichikawa A, Niino D, Sugita Y, Yufu Y, Choi I, Abe Y, Uike N, Nagafuji K, Okamura T, Akashi K, Takayanagi R, Shiratsuchi M, Ohshima K. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 126: 2193-2201, 2015
7. Uryu H, Hashimoto D, Kato K, Hayase E, Matsuoka S, Ogasawara R, Takahashi S, Maeda Y, Iwasaki H, Miyamoto T, Saijo S, Iwakura Y, Hill GR, Akashi K, Teshima T. -Mannan induces Th17-mediated pulmonary graft-versus-host disease in mice. *Blood* 125: 3014-3023, 2015
8. Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-Hora M, Akashi K, Yamasaki S. Dectin-2 Is a Direct Receptor for Mannose-Capped Lipoarabinomannan of Mycobacteria. *Immunity* 41: 402-413, 2014
9. Miyawaki K, Arinobu Y, Iwasaki H, Kohno K, Tsuzuki H, Iino T, Shima T, Kikushige Y, Takenaka K, Miyamoto T, Akashi K. CD41 marks the initial myelo-erythroid lineage specification in adult mouse hematopoiesis: redefinition of murine common myeloid progenitor. *Stem Cells*, 33, 976-987, 2014
10. Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I, Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T, Akashi K. The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment. *Exp Hematol* 42, 163-171, 2014.
11. Damm, F, Mylonas, E, Cosson, A, Yoshida, K, Miyano, S, Kikushige, Y, Davi, F, Lambert, J, Gautheret, D, Solary, E, Akashi K, Vainchenker, W, Mercher, T, Droin, N, Ogawa, S, Nguyen-Khac, F and Bernard, O.A. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov*, 4, 1088-1101, 2014.
12. Kikushige, Y, Miyamoto T. Hematopoietic stem cell aging and chronic

lymphocytic leukemia pathogenesis. Int J Hematol, 100, 335-340, 2014

13. Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Yuda J, Tochigi T, Yoshimoto G, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Mizuno S, Goto N, Akashi K. The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell. Exp Hematol 42: 955-965, 2014  
14. Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. Blood 121: 1316-1325, 2013

〔学会発表〕(計13件)

1.赤司浩一：骨髄系白血病幹細胞における共通の鍵分子TIM-3とその臨床応用、第39回阿蘇シンポジウム、08/01/2015、阿蘇  
2.Koichi Akashi：TIM-3 and its ligand, galectin-9 constitute an autocrine loop to maintain stem cells in most human myeloid malignancies、2015 ISEH Annual Meeting、09/17/2015、Kyoto  
3.Koichi Akashi：TIM-3 and its ligand, galectin-9, constitute an autocrine loop critical for development of human myeloid leukemia stem cells、JSPS-NUS Joint Symposium“New Horizons in Normal and Cancer Stem Cell Research”、01/14/2016、Singapore  
4.赤司浩一：Cancer Stem Cell、第87回日本内分泌学会学術総会、04/24/2014、福岡  
5.Koichi Akashi：TIM-3, as a Target for Eradication of Cancer Stem Cells、The Uehara Memorial Foundation Symposium、06/17/2014、東京  
6.赤司浩一：白血病幹細胞研究のすゝめ、第76回日本血液学会学術集会(学会賞受賞講演) 11/02/2014、大阪  
7.Koichi Akashi：TIM-3 Signaling and Human Myeloid Leukemia Stem Cell Development、KEYSTONE SYMPOSIA、02/26/2015、Colorado USA  
8.赤司浩一：造血幹細胞と造血器癌幹細胞、第110回日本内科学会、04/13/2013、東京  
9.Koichi Akashi：Epigenetic Landscape of Hematopoietic Lineage Commitment Can Be Visualized by Analysis of Incorporated H3.3 Variant、ISEH 42nd Annual Scientific Meeting、05/25/2013、Vienna, Austria  
10.Koichi Akashi：Epigenetic landscape of hematopoiesis visualized by histone H3.3 incorporation is deregulated in acute myeloid leukemia、第72回日本癌学会学術総会、10/05/2013、横浜  
11.Koichi Akashi：Cancer Stem Cells in

Human Hematological Malignancies、第72回日本癌学会学術総会、10/05/2013、横浜  
12.Koichi Akashi：Visualization of the epigenetic landscape of hematopoietic lineage commitment based on the analysis of histone H3.3 incorporation、第75回日本血液学会学術集会、10/13/2013、札幌  
13.赤司浩一：造血器癌幹細胞 Malignant hematopoietic stem cell、第55回日本小児血液・がん学会学術集会、12/01/2013、福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.1nai.med.kyushu-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤司 浩一 (Akashi Koichi)  
九州大学大学院 医学研究院  
病態修復内科学 教授  
研究者番号：80380385

### (2) 研究分担者

宮本 敏浩 (Miyamoto Toshihiro)  
九州大学大学院 医学研究院  
病態修復内科学 講師  
研究者番号：70343324

### (3) 研究分担者

岩崎 浩己 (Iwasaki Hiromi)  
九州大学病院  
遺伝子細胞療法部 准教授  
研究者番号：20403925

### (4) 研究分担者

竹中 克斗 (Takenaka Katsuto)  
九州大学病院  
遺伝子細胞療法部 講師  
研究者番号：30301295