

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2015

課題番号：26713034

研究課題名(和文)TIM-3/galectin-9を軸とした新規白血病幹細胞治療標的分子の同定

研究課題名(英文)Identification of the novel therapeutic target molecules for leukemia stem cells based on TIM-3/galectin-9 interaction

研究代表者

菊繁 吉謙(Kikushige, Yoshikane)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40619706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒト急性骨髄性白血病における白血病幹細胞特異的表面抗原としてTIM-3を同定したが、その機能は不明であった。本研究ではヒト白血病幹細胞がTIM-3リガンドであるgalectin-9を分泌するautocrine様式にて、自身にTIM-3シグナルを生じるというユニークなautocrine stimulatory loopの存在を見出した。TIM-3シグナルは、NF- $\kappa$ Bと $\beta$ -cateninの共活性化を白血病幹細胞に生じていた。さらにこのautocrine loopは、ヒト骨髄系腫瘍全般においてTIM-3発現異常造血幹細胞がクローンサイズを拡大させていく過程で利用されている事を見いだした。

研究成果の概要(英文)：T-cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3) is expressed on surface of self-renewing leukemic stem cells (LSCs) in acute myeloid leukemia (AML). Here we show that TIM-3 and its ligand, galectin-9 (Gal-9), constitute an autocrine loop critical for human AML LSC development. Serum Gal-9 was significantly elevated in primary AML patients and in mice xenografted with human AML. Neutralization of Gal-9 inhibited xenogeneic reconstitution of human AML, and Gal-9 ligation of TIM-3 co-activated NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin signaling, suggesting that TIM-3 signaling is necessary for LSC self-renewal. Interestingly, identical changes were progressively involved in transformation into myeloid leukemia from a variety of pre-leukemic disorders. Thus, molecules constituting the TIM-3/Gal-9 autocrine loop could be therapeutic targets applicable to most types of myeloid leukemia.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：白血病幹細胞 急性骨髄性白血病 がん幹細胞 TIM-3

1. 研究開始当初の背景

我々は、ヒト急性骨髄性白血病(AML)の白血病幹細胞(LSCs)と正常造血幹細胞(HSCs)の網羅的遺伝子発現解析を行い、HSCsに発現せずに、LSCsにのみ発現する表面抗原として、T-cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3)を同定した(Kikushige et al., Cell Stem Cell, 2010)。我々のLSCsにおけるTIM-3発現の報告に引き続き、同様の報告が別のグループからも行われ注目を集めた(Jan et al., PNAS, 2011)。さらに近年ではAMLのみならず、種々の固形腫瘍においても腫瘍細胞が異所性にTIM-3を発現しており、病理学的にTIM-3高発現が予後不良因子であることも報告された。これらの研究結果から、TIM-3が腫瘍細胞において何らかの機能分子である可能性が示唆された。その一方でTIM-3はT細胞においては、近年注目を集めているPD-1等の同様の免疫チェックポイント分子として注目を集めており、その下流シグナル等に関してもT細胞と腫瘍細胞において異なっているのか否かについても不明であった。そこで本研究課題ではTIM-3分子とそのligandであるgalectin-9に着目してLSCにおけるTIM-3シグナルの解明を目指して研究を行った。

2. 研究の目的

TIM-3のヒトLSCsにおける機能、シグナルを解明し、新規LSCs特異的な治療標的分子の同定の基盤を確立する。

3. 研究の方法

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。さらに、ヒトAML患者サンプルよりLSCsを含むCD34+細胞分画を純化し、TIM-3リガンドとして報告のあるgalectin-9を添加して生じる遺伝子変化をマイクロアレイにより解析した。さらにリガンド添加後に生じた遺伝子発現変化をpathway enrichment analysisにより、TIM-3シグナルの下流に位置するシグナル経路の推定を行った。

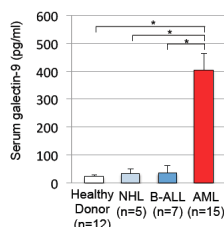
4. 研究成果

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

図1 血清galectin-9濃度はAML症例で上昇している

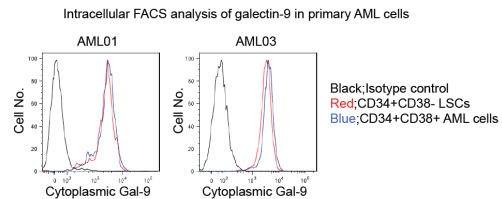
Serum human Gal-9 was measured by ELISA



血清galectin-9はAML症例で特異的に上昇している

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。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(図2)

図2 CD34+AML細胞は高いレベルの細胞内galectin-9タンパクを発現している

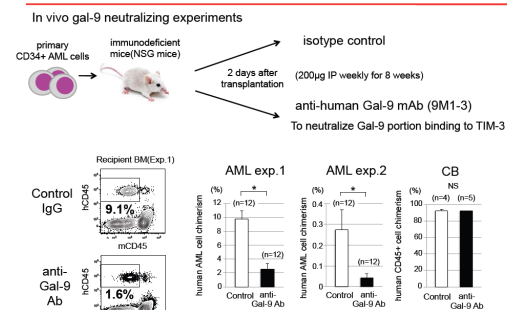


次に我々は、AML細胞を免疫不全マウスに異種移植を行い、ヒトAMLを再構築したレシピエントマウス内でのヒトgalectin-9血清濃度を測定したところ、AML細胞を再構築したレシピエントマウスではヒトgalectin-9濃度が患者血清中と同様に上昇していたが、臍帯血やB細胞性急性リンパ球性白血病を移植したマウスの血清中からはヒトgalectin-9はほとんど検出されなかった。すなわち、AMLおよびLSCがマウス内でTIM-3 ligandであるgalectin-9をautocrine様式で分泌して、自身の発現するTIM-3を刺激することで、恒常的なTIM-3シグナルがAML/LSCにおいて生じ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

図3 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



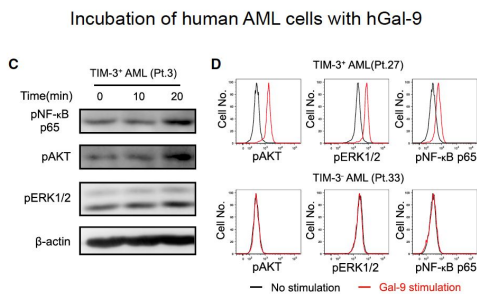
中和抗体を投与した群では、AMLの再構築が抑制された。すなわち、TIM-3/galectin-9 autocrine刺激系がLSCの機能を正に制御し

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

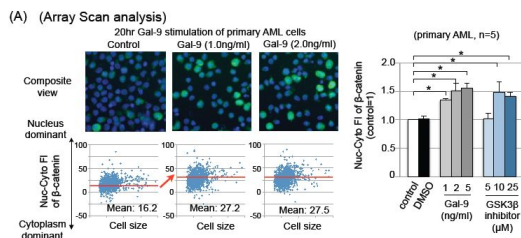
次に TIM-3 シグナル下流でどのような分子が LSC の機能制御に寄与するかを明らかにするために、ヒト AML 細胞を galectin-9 で刺激し、マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現の変化を解析した。有意に発現が変化した遺伝子群を抽出し、pathway enrichment 解析を行い、どのような signal pathway に関連する遺伝子が TIM-3 刺激により変化したかを検証したところ、NF- $\kappa$ B 関連 signal pathway と  $\beta$ -catenin 関連 signal pathway が有意に enrich されることが明らかになった。図 4 に示すように 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。

図4 TIM-3シグナルはNF- $\kappa$ Bの活性化を生じる



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 タンパク質の核内移行が TIM-3 刺激により促進されることを確認した(図 5)。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。

図5 TIM-3シグナルは $\beta$ -cateninの核内移行を促進させる

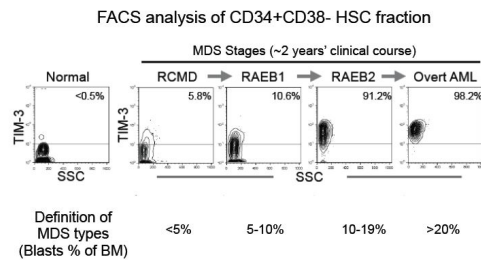


### 4) TIM-3/galectin-9 autocrine 刺激系は、AML 以外の骨髄系腫瘍においても普遍的に LSC のクローン優位性獲得のために利用されている。

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

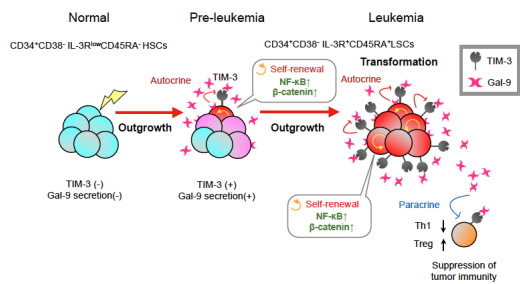
御していることが明らかになった。次に我々は、AML 以外の骨髄系腫瘍において同様の TIM-3/galectin-9 autocrine 刺激系が機能している可能性について検討した。図 6 に示すように我々は、骨髄異型性症候群(MDS)の症例の CD34+CD38-造血幹細胞分画において、LSC 様の表面形質を示す TIM-3 陽性異常幹細胞集団が病期進展とともに増加していくことを見いだした。

図6 MDS病期進展に伴うTIM-3+ LSC cloneの増大



その他の骨髄系腫瘍においても病初期から 2 次性 AML へと進展する過程でも同様に TIM-3 陽性 LSC 様異常造血幹細胞クローンの拡大を認めた。さらに、これらの骨髄系腫瘍においては 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 7)。

図7 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に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。

## 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7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. 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

5. 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.

6. Kikushige Y, Miyamoto, T. Hematopoietic stem cell aging and chronic lymphocytic leukemia pathogenesis. *Int J Hematol*, 100, 335-340, 2014

7. 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

[学会発表](計6件)

1 20th Winter Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation. February 26th, 2016

2 第53回日本癌治療学会学術集会  
平成27年10月29日発表

3 第77回日本血液学会学術集会  
平成27年10月18日発表

4 第74回日本癌学会学術総会  
平成27年10月9日発表

5 第37回分子生物学会年会  
平成26年11月27日発表

6 第73回日本癌学会学術総会  
平成26年9月26日発表

[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

菊繁吉謙 (Kikushige, Yoshikane)

九州大学大学院 医学研究院 助教

研究者番号: 40619706