

論文内容の要旨

Functional expression of Tim-3 on blasts and clinical impact of its ligand galectin-9 in  
myelodysplastic syndromes

骨髓異形成症候群における芽球上 Tim-3 の機能的発現及びそのリガンド galectin-9 の臨床的意義

日本医科大学大学院研究科 血液内科学分野  
大学院生 朝山 敏夫

Oncotarget vol. 8, No 51. (2017)

掲載

## 【背景】

骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome, MDS)は難治性の血球減少および急性白血病への進展リスクを擁する造血クローンの異常に起因する疾患である。これまでに我々はMDSの病態進行に種々の免疫異常が関与する事を報告してきた。本研究では、免疫チェックポイント分子であるT cell immunoglobulin mucin-3(Tim-3)、及びそのリガンドの一つであるgalectin-9(Gal-9)に着目し、Tim-3-Gal-9経路とMDSの病態進行及び予後との関連について検討した。

## 【方法】

- 1) 健常者及びMDS患者の骨髄単核球において芽球細胞での細胞表面Tim-3発現をフローサイトメトリー法で解析し、MDS各病期間で比較検討した。
- 2) MDS細胞株F-36Pに、ヒストローマ細胞株HS-5培養上清、HS-5培養上清に含まれるサイトカイン(IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )、あるいはMDS病態との関連が報告されているサイトカイン(IL-10, VEGF, TGF- $\beta$ 1)を添加培養し、Tim-3発現が誘導されるか検討した。さらに、Tim-3発現誘導に関与するシグナルを明らかにするため、種々の細胞内シグナル伝達阻害薬を用いて検討した。
- 3) F-36P細胞をFACS sorting法によりTim-3陽性分画及び陰性分画に分離、それぞれのmRNAを調整し、microarray法による網羅的遺伝子解析を行い、Tim-3陽性分画における遺伝子発現の特徴について検討した。さらに、その結果をもとにIngenuity pathway analysisを用いてTim-3の遺伝子ネットワーク/パスウェイ解析を行なった。またF-36P細胞に対して抗Tim-3ブロッキング抗体を用いてTim-3の機能解析を行った。
- 4) 健常者・MDSより転化した急性白血病(AL-MDS)患者の末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)、MDS細胞株の培養上清中の可溶性Gal-9値をELISA法で解析した。またF-36PにMDS関連サイトカイン(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )を添加し、Gal-9発現誘導の有無について検討した。
- 5) MDSおよびAL-MDS患者70名の血漿中Gal-9値を測定し、French America-British(以下FAB)分類、WHO分類、International prognostic scoring system(IPSS)、WHO classification-based scoring system(WPSS)に基づいた各病期、各リスク群での血漿中Gal-9値を比較検討した。
- 6) MDS患者40例を血漿中Gal-9高値群(>10 ng/mL)及び低値群( $\leq$ 10 ng/mL)の2群に分割し、それぞれの全生存期間を比較し、さらに血漿中Gal-9値が予後不良因子となるか多変量解析を行なった。

## 【結果】

- 1) 細胞表面Tim-3発現はCD45 blast gating法での芽球細胞およびCD34陽性芽球細胞のいずれにおいても高リスクMDS群、AL-MDS群で有意に亢進していた。
- 2) F-36P細胞において細胞表面Tim-3発現、Tim-3 mRNA発現はHS-5培養上清やTGF- $\beta$ 1の添加により誘導された。前者にはMAPKシグナルが、後者にはTGF- $\beta$ シグナルが関与している事が示唆された。
- 3) Tim-3陽性F-36P細胞ではTim-3陰性F-36P細胞に比して細胞増殖に関与する遺伝子(*CXCR4*, *IL-6R*, *CXCL8*)、抗アポトーシス活性を有する遺伝子(*CCL2*, *WNT11*, *IL-2R*)の発現がTim-3陰性分画に比べて亢進していた。さらに、抗Tim-3ブロッキング抗体を用いることでF-36Pの細胞増殖は阻害された。
- 4) 可溶性Gal-9はMDS細胞株およびAL-MDS患者PBMC(MDS芽球>90%)の培養上清中において上昇することから、MDS芽球より産生することが示唆された。F-36P細胞に対しIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ を添加することでGal-9 mRNAおよび可溶性Gal-9の発現、産生が誘導された。

- 5) FAB 分類における AL-MDS および IPSS Int-2/high において血漿中 Gal-9 値は有意に上昇していた。
- 6) 血漿中 Gal-9 高値群では低値群に比べ全生存期間が有意に短縮していた。また多変量解析において血漿中 Gal-9 高値は独立した予後不良因子であった。

#### 【結語及び考察】

本研究により、MDS において Tim-3、Gal-9 が病態進行に関与することが示された。Tim-3/Gal-9 経路についてさらに検討する事で、同経路が MDS における新たな治療標的となる可能性が示唆された。