

## 論文審査の結果の要旨

### 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医学研究科 病態制御腫瘍内科学分野

大学院生 朝山 敏夫

Oncotarget 第8巻, 51号.88904-88917頁 2017年掲載

MDSの病態進行に種々の免疫異常が関与する。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。健常者及び MDS 患者の骨髓単核球において細胞表面 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。MDS 細胞株 F-36P に9種のサイトカイン (IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF 等) を添加培養し、Tim-3 発現誘導を検討した。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。この 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 陽性分画細胞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。さらに 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) と F-36P の培養上清中の可溶性 Gal-9 値を ELISA 法で解析した。また Gal-9 発現誘導実験を F-36P に MDS 関連サイトカイン (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) を添加し検討した。さらに MDS および AL-MDS 患者 70 名の血漿中 Gal-9 値を測定し、MDS の各群での血漿中 Gal-9 値を比較検討し、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。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。F-36P 細胞において Tim-3 蛋白、Tim-3 mRNA 発現は TGF- $\beta$ 1 等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- $\beta$  シグナルの関与が示唆された。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おり、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。Gal-9 分子に関しては MDS 細胞株および AL-MDS-PBMC の培養上清中において可溶性 Gal-9 の上昇が認められることから、Gal-9 は MDS 芽球より産生することが示唆され、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  を添加することで F-36P 細胞内 Gal-9 mRNA および可溶性 Gal-9 の産生が誘導された。*de novo* AL-MDS および予後不良群において血漿中 Gal-9 値は有意に上昇し、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ることが分かった。多変量解析でも血漿中 Gal-9 高値は独立した予後不良因子であった。本研究により、Tim-3、Gal-9 が MDS 病態進行に関与することが示され、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。以上の結果から、学位論文として十分価値あるものと認定した。