

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 全てのヒト骨髄系腫瘍に共通するがん幹細胞の不均一性獲得・維持メカニズム解明と治療標的分子探索
(英語) Elucidation of common molecular machinery for the acquisition and maintenance of the heterogeneity in human myeloid leukemia stem cells
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人九州大学 大学院医学研究院 教授 赤司 浩一
所属 役職 氏名： (英語) Kyushu University, Professor, Koichi Akashi
- 実施期間： 平成28年5月25日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 骨髄系造血器腫瘍におけるがん幹細胞亜分画分離とクローン構造解明、および生体内機能解析
開発課題名： (英語) Analysis of clonal architectures and cellular function of newly purified myeloid leukemic stem cells
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人九州大学 大学院医学研究院 教授 赤司 浩一
所属 役職 氏名： (英語) Kyushu University, Professor, Koichi Akashi
- 分担研究 (日本語) 新規ヒト骨髄系がん幹細胞亜分画の in vivo 解析
開発課題名： (英語) In vivo analysis of novel leukemic stem cell subpopulation
研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人九州大学病院血液腫瘍心血管内科 講師 竹中 克斗
所属 役職 氏名： (英語) Kyushu University, Lecturer, Katsuto Takenaka
- 分担研究 (日本語) 治療経過に伴うがん幹細胞クローン変化の解析
開発課題名： (英語) Analysis of clonal architecture alteration of leukemic stem cells along with clinical course
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人九州大学病院血液腫瘍心血管内科 助教 森 康雄
所属 役職 氏名： (英語) Kyushu University, assistant professor, Yasuo Mori

分担研究 (日本語) 新規ヒト骨髄系がん幹細胞亜分画純化とオミクス解析、および新規がん幹細胞抗原の機能解明

開発課題名: (英語) Prospective isolation and multi-omics analysis of novel sub-populations of human myeloid leukemia stem cell and the elucidation of molecular function of newly identified leukemic stem cell specific molecules

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人九州大学 大学院医学研究院 助教 菊繁 吉謙

所属 役職 氏名: (英語) Kyushu University, assistant professor, Yoshikane Kikushige

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

我々はヒト骨髄系腫瘍の不均一性を理解するうえで、腫瘍の根源である白血病幹細胞の不均一性獲得、維持機構の解明が重要であると考えた。これまでに我々は、ヒト骨髄系腫瘍におけるがん幹細胞である白血病幹細胞特異的な表面抗原として **TIM-3** 分子を同定し、また **TIM-3** 分子が骨髄系白血病幹細胞の自己複製能力を強化するシグナル分子であることを先行研究において報告してきた。そこで、**TIM-3** をはじめとした複数の新規白血病幹細胞抗原を用いて、骨髄系白血病幹細胞亜分画をプロスペクティブに純化し、純化した白血病幹細胞、幹細胞亜分画に対してマルチオミクス解析手法を用いて全ての骨髄系白血病幹細胞に共通するがん幹細胞の不均一性獲得、維持機構の分子基盤の解明を行うことを本研究計画の目的とした。

本年度は **TIM-3** に加えて新規に同定した複数の白血病幹細胞抗原を用いて骨髄系白血病幹細胞亜分画の純化を行い、*in vivo* での白血病幹細胞活性および遺伝子発現プロファイル解析を行なった。さらにプロスペクティブに純化した亜分画のクローン解析に関してもエキソンシーケンスを複数症例で行い、クローン構造解析も同時に継続している。これらの解析を通じて白血病幹細胞の機能的、あるいはゲノムレベルでの不均一性の解明に取り組む。

さらに、上記白血病幹細胞亜分画の純化およびオミクス解析に加えて、白血病幹細胞抗原 **TIM-3** シグナル経路の解明にも取り組んでいる。先行研究において **TIM-3** シグナルが自己複製能力の制御に重要な β -catenin の活性化を白血病幹細胞において誘導することを報告したが、本年度はその下流の具体的な分子メカニズムの解明にとりくみ、**TIM-3** シグナルが特定の **Src family kinase** の活性化を介して **canonical Wnt pathway** の活性化を直接的に誘導することを見出した。すなわち、**TIM-3** シグナルは白血病幹細胞において、遺伝子変異に依存しない恒常的な β -catenin 活性化経路である可能性が示唆され、現在さらなる解析を継続している。

これらの解析を通じて、骨髄系白血病幹細胞に共通するがん幹細胞の不均一性獲得、維持機構の分子基盤の解明に引き続き取り組む予定である。

英文

Acute myeloid leukemia (AML) originates from self-renewing leukemic stem cells (LSCs). LSCs constitute hierarchical system resembling normal hematopoiesis, and contribute to maintenance and progression of AML. Similar to AML, most of myeloid malignancies derived from self-renewing myeloid LSCs, and therefore, we considered that elucidation of common molecular mechanisms for acquiring clonal and functional heterogeneity of LSCs should be necessary to understand the tumor heterogeneity of human myeloid malignancies.

We previously identified LSCs-specific molecule TIM-3 in human AML, and also clarified that human myeloid LSCs commonly utilized TIM-3 signaling pathway to outcompete the normal hematopoietic stem cells (HSCs) during disease progression. Furthermore, we have already identified several novel surface molecules specifically expressed in myeloid LSCs and succeeded in the prospective isolation of sub fraction of myeloid LSCs by utilizing TIM-3 and novel surface molecules.

In this study, we try to clarify the molecular machineries for acquiring clonal and functional heterogeneity of myeloid LSCs by prospective isolation of LSCs and sub fraction of LSCs. Prospective isolation of myeloid LSCs and sub fraction of LSCs enable us to analyze the clonal and functional heterogeneity of myeloid LSCs through the combination of multi-omics analysis and xenotransplantation experiments.

This year, we prospectively isolated sub fraction of LSCs from primary AML cells, and performed exome sequencing, transcriptome analysis and xenotransplantation experiments to assess the clonal and functional heterogeneity of myeloid LSCs. In addition to the sub fraction analysis in human myeloid LSCs, we also tried to clarify the molecular function of LSCs-specific molecules including TIM-3. Previously, we reported that TIM-3 signaling induce the nucleus accumulation of β -catenin protein in human myeloid malignancies; however its precise molecular mechanism remains still elusive. We, therefore, sought to identify the molecular mechanisms how TIM-3 signaling activate β -catenin pathways. We identified that the specific Src family kinase mediate TIM-3 signaling after the ligation of galectin-9, a TIM-3 ligand, and directly activate canonical Wnt pathway independent of Wnt ligands.

Through the analysis of human myeloid LSCs, we try to understand the molecular mechanisms for inducing heterogeneity of myeloid malignancies.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 17 件）

1. K. Miyawaki, H. Iwasaki, T. Jiromaru, H. Kusumoto, A. Yurino, T. Sugio, Y. Uehara, J. Odawara, S. Daitoku, Y. Kunisaki, Y. Mori, Y. Arinobu, H. Tsuzuki, Y. Kikushige, T. Iino, K. Kato, K. Takenaka, T. Miyamoto, T. Maeda, **K. Akashi**, Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. *Blood*, in press (2017).
2. Tominaga K, Shimamura T, Kimura N, Murayama T, Matsubara D, Kanauchi H, Niida A, Shimizu S, Nishioka K, Tsuji EI, Yano M, Sugano S, Shimono Y, Ishii H, Saya H, Mori M, **Akashi K**, Tada KI, Ogawa T, Tojo A, Miyano S, Gotoh N. Addiction to the IGF2-ID1-IGF2 circuit for maintenance of the breast cancer stem-like cells. *Oncogene*. 36:1276-1286, 2017
3. Shimoji S, Hashimoto D, Tsujigiwa H, Miyawaki K, Kato K, Takahashi S, Ogasawara R, Jiromaru T, Iwasaki H, Miyamoto T, **Akashi K**, Teshima T. Graft-versus-host disease targets ovary and causes female infertility in mice. *Blood*. 129: 1216-1225, 2017
4. M. Minami, T. Arita, H. Iwasaki, T. Muta, T. Aoki, K. Aoki, S. Yamasaki, T. Matsushima, K. Kato, K. Takenaka, K. Tanimoto, T. Kamimura, R. Ogawa, **K. Akashi**, T. Miyamoto, Comparative analysis of pulmonary hypertension in patients treated with imatinib, nilotinib and dasatinib. *Br J Haematol*. 177:578-587, 2017
5. Tochigi T, Aoki T, Kikushige Y, Kamimura T, Ito Y, Shima T, Yamauchi T, Mori Y, Yoshimoto G, Kamezaki K, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, **Akashi K**, Miyamoto T. Mobilization of human immature hematopoietic progenitors through combinatory use of bortezomib and immunomodulatory drugs. *Int J Hematol*. 105:423-432, 2017
6. Sugiyama D, Joshi A, Kulkeaw K, Tan KS, Yokoo-Inoue T, Mizuochi-Yanagi C, Yasuda K, Doi A, Iino T, Itoh M, Nagao-Sato S, Tani K, **Akashi K**, Hayashizaki Y, Suzuki H, Kawaji H, Carninci P, Forrest AR. A Transcriptional switch point during hematopoietic stem and progenitor cell ontogeny. *Stem Cells Dev*. 26:314-327, 2017
7. Komatsu N, Kirito K, Shimoda K, Ishikawa T, Ohishi K, Ohyashiki K, Takahashi N, Okada H, Amagasaki T, Yonezu T, **Akashi K**. Assessing the safety and efficacy of ruxolitinib in a multicenter, open-label study in Japanese patients with myelofibrosis. *Int J Hematol*. 105:309-317, 2017
8. Kuriyama T, Kato K, Sakamoto K, Hayashi M, Takashima S, Mori Y, Takenaka K, Iwasaki H, Teshima T, Harada N, Nagafuji K, Miyamoto T, **Akashi K**. Cord Blood Transplantation Following Reduced-intensity Conditioning for Adult-onset Inherited Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Intern Med*. 55: 667-671, 2016
9. Arita S, Shirakawa T, Matsushita Y, Shimokawa HK, Hirano G, Makiyama A, Shibata Y, Tamura S, Esaki T, Mitsugi K, Ariyama H, Kusaba H, **Akashi K**, Baba E. Efficacy and Safety of TAS-102 in Clinical Practice of Salvage Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Anticancer Res*. 36: 1959-1966, 2016

10. Daitoku S, Takenaka K, Yamauchi T, Yurino A, Jinnouchi F, Nunomura T, Eto T, Kamimura T, Higuchi M, Harada N, Saito N, Miyamoto T, Iwasaki H, **Akashi K**. Calreticulin mutation does not contribute to disease progression in essential thrombocythemia by inhibiting phagocytosis. *Exp Hematol*. 44: 817-825, 2016
11. Sugio T, Kato K, Aoki T, Ohta T, Saito N, Yoshida S, Kawano I, Henzan H, Kadowaki M, Takase K, Muta T, Miyawaki K, Yamauchi T, Shima T, Takashima S, Mori Y, Yoshimoto G, Kamezaki K, Takenaka K, Iwasaki H, Ogawa R, Ohno Y, Eto T, Kamimura T, Miyamoto T, **Akashi K**. Mogamulizumab Treatment Prior to Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Induces Severe Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 22: 1608-1614, 2016
12. Shirakawa T, Nakano M, Nio K, Tamura S, Komoda M, Kumagai H, Uchino K, Odashiro K, Arita S, Shibata Y, Ariyama H, Kusaba H, **Akashi K**, Baba E. Retrospective analysis of cardiovascular diseases related to chemotherapies for advanced solid tumor patients. *Anticancer Drugs*. 27: 891-898, 2016
13. Yurino A, Takenaka K, Yamauchi T, Nunomura T, Uehara Y, Jinnouchi F, Miyawaki K, Kikushige Y, Kato K, Miyamoto T, Iwasaki H, Kunisaki Y, **Akashi K**. Enhanced Reconstitution of Human Erythropoiesis and Thrombopoiesis in an Immunodeficient Mouse Model with KitWv Mutations. *Stem Cell Reports*. 13:425-438, 2016
14. Tsuzuki H, Arinobu Y, Miyawaki K, Takaki A, Ota SI, Ota Y, Mitoma H, Akahoshi M, Mori Y, Iwasaki H, Niino H, Tsukamoto H, **Akashi K**. Functional interleukin-33 receptors are expressed in early progenitor stages of allergy-related granulocytes. *Immunology*. 150: 64-73, 2016
15. Miyamoto T, Takashima S, Kato K, Takase K, Yoshimoto G, Yoshida S, Henzan H, Osaki K, Kamimura T, Iwasaki H, Eto T, Teshima T, Nagafuji K, **Akashi K**. Comparison of cyclosporine and tacrolimus combined with mycophenolate mofetil in prophylaxis for graft-versus-host disease after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation. *Int J Hematol*. 105: 92-99, 2016
16. Takenaka K, Shimoda K, Uchida N, Shimomura T, Nagafuji K, Kondo T, Shibayama H, Mori T, Usuki K, Azuma T, Tsutsumi Y, Tanaka J, Dairaku H, Matsuo K, Ozawa K, Kurokawa M, Arai S, **Akashi K**. Clinical features and outcomes of patients with primary myelofibrosis in Japan: report of a 17-year nationwide survey by the Idiopathic Disorders of Hematopoietic Organs Research Committee of Japan. *Int J Hematol* 105: 59-69, 2016
17. Suetsugu K, Ikesue H, Miyamoto T, Shiratsuchi M, Yamamoto-Taguchi N, Tsuchiya Y, Matsukawa K, Uchida M, Watanabe H, **Akashi K**, Masuda S. Analysis of the variable factors influencing tacrolimus blood concentration during the switch from continuous intravenous infusion to oral administration after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 43: 1974-1983, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. “ヒト白血病幹細胞研究の進歩”口頭, 赤司浩一, 第 51 回日本血液学会春季北海道地方会, 2016/4/9, 国内.
2. “ヒト白血病幹細胞研究の進歩”口頭, 赤司浩一, 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2016/5/31, 国内.
3. “A TIM-3/Gal-9 autocrine stimulatory loop drives self-renewal of human myeloid leukemia stem cells and leukemic progression”口頭, 赤司浩一, THE 41st 1NAITO CONFERENCE, 2016/7/6, 国内.
4. “TIM-3 and Its Ligand, Galectin-9, Constitute an Autocrine Loop Universally Critical for Development of Human Myeloid Leukemia Stem Cells”口頭, 赤司浩一, JCA-AACR Special Joint Conference, 2016/7/14, 国外.
5. “ヒト白血病幹細胞研究の進歩”口頭, 赤司浩一, 第 26 回日本サイトメトリー学会学術集会, 2016/7/23, 国内.
6. “TIM-3/Galectin-9 axis is a potential therapeutic target for human myeloid leukemia stem cells”口頭, 赤司浩一, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016/7/29, 国内.
7. “幹細胞コンセプト導入による造血器腫瘍根治への挑戦”口頭, 赤司浩一, 第 17 回日本検査血液学会学術集会, 2016/8/6, 国内.
8. “Targeting leukemic stem cells to cure AML patients”口頭, 赤司浩一, The 14th National Congress of Hematology, 2016/10/28, 国外.
9. “An Autocrine Loop Involving β -Catenin Pathway is Critical for Development of Human Myeloid Leukemia Stem Cells”口頭, 赤司浩一, The 47th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, 2016/11/8, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし