

- virus-associated hemorrhagic cystitis following allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 18: 458-65, 2012.
8. Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Miyamoto T, Shimono N, Kamimura T, Akashi K. Fatal candidemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. *J Infect Chemother* 18: 741-746, 2012
  9. Mori Y, Teshima T, Kamezaki K, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Nagafuji K, Eto T, Akashi K. Validation of pretransplantation assessment of mortality risk score in the outcome of hematopoietic SCT in non-Caucasians. *Bone Marrow Transplant* 47: 1075-1081, 2012
  10. Uchida M, Ikesue H, Miyamoto T, Kato K, Suetsugu K, Ichinose K, Hiraiwa H, Sakurai A, Takenaka K, Muta T, Iwasaki H, Teshima T, Shiratsuchi M, Egashira N, Akashi K, Oishi R. Effectiveness and safety of antiemetic aprepitant in Japanese patients receiving high-dose chemotherapy prior to autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Pharm Bull* 36: 819-824, 2013
  11. Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Henzan H, Numata A, Ito Y, Takenaka K, Iwasaki H, Kamimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K. Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 121: 840-848, 2013
2. 学会発表
    1. 宮本敏浩 : CLL の幹細胞. 第 50 回日本リンパ網内系学会、2010 年 6 月 18-19 日、新潟
    2. Miyamoto T: Human leukemia stem cells. 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22-24 日、大阪
    3. Miyamoto T: Alterations of Phenotype and Gene Expression during Progression of Myelodysplastic Syndrome into Acute Myelogenous Leukemia. 11<sup>th</sup> International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. 2011.5.18-21, 2011 Edinburgh, UK
    4. Miyamoto T: Human herpes virus 6-associated encephalitis following allogeneic HSCT. 2011 Beijing International Stem Cell Transplantation Symposium. 2011.9.16-17, Beijing, China
    5. Miyamoto T, Kikushige Y, Shima T, Akashi K. TIM-3 Is a Promising Target to Eradicate Acute Myeloid Leukemia Stem Cells Sparing Normal Hematopoietic Stem Cells. 53<sup>rd</sup> American Society of Hematology Annual Meeting. 2011.12.12, San Diego, CA, USA
    6. Miyamoto T: Mobilization of allogeneic and autologous peripheral blood stem cells. Asian Workshop for Hematopoietic Stem Cell Transplantation 2012.4.20-22, Kumamoto, Japan
    7. 宮本敏浩: 当施設における同種造血幹細胞移植後の出血性膀胱炎. ワークショップ1.造血幹細胞移植後のウイルス感染症. 第 34 回日本造血細胞移植学会、2012 年 2 月 24 日、大阪
    8. 宮本敏浩: ボルテゾミブ併用メルファラン大量前処置による自己末梢血幹細胞移植の検

討第 37 回日本骨髓腫学会学術集会  
(2012.7.7-8 京都)

G.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業  
(免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業)  
総合分担研究報告書

全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植後の T 細胞受容体レパトア多様性の  
変化に関する研究

研究者分担者 新納宏昭

九州大学病院 免疫・膠原病・感染症内科 助教

研究要旨

全身性硬化症 (SSc) に対する自己造血幹細胞移植 (自己 HSCT) は高い臨床効果を認めているが、その有効性の機序については不明の部分も多い。本研究では自己 HSCT 前後で T 細胞受容体 (TCR) レパトアの多様性の変化を解析することにより、自己 HSCT 後の免疫学的再構築による有効性の機序を明らかにする事を目的とした。当施設において自己 HSCT を施行した SSc 患者、および健常人を対象とした。SSc 患者および健常人末梢血単核球より RNA を調製し、cDNA 合成後に各 TCR V $\beta$  特異的プライマーを用いて PCR 増幅を行い、TCR V $\beta$  レパトア分布および相補性決定領域 3 (CDR3) サイズ分布解析を行った。SSc 患者において治療前は TCR V $\beta$  レパトアに偏りが見られ、CDR3 サイズでは oligoclonal または monoclonal な分布を示す割合が健常人より有意に高かった。経時的に評価したところ自己 HSCT 後早期より、CDR3 サイズの oligoclonal または monoclonal な分布を示す割合は有意に減少し、長期間にわたり維持された。以上、SSc に対する自己 HSCT により TCR レパトアの多様性の回復が早期より認められると共に、長期間持続しており、高い臨床効果をもたらす一因と考えられた。

A. 研究目的

全身性硬化症 (SSc) に対する自己造血幹細胞移植 (自己 HSCT) は高い臨床効果を認めているが、その有効性の機序については不明の部分も多い。本研究では自己 HSCT 前後で T 細胞受容体 (TCR) レパトアの多様性の変化を解析することにより、自己 HSCT 後の免疫学的再構築による有効性の機序を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

当施設において自己 HSCT を施行した SSc 患者 12 名、および健常人 6 名を対象とした。

SSc 患者 (HSCT 前と HSCT 後 1-7 ヶ月、12-18 ヶ月、36-48 ヶ月) および健常人末梢血単核球より RNA を調製し、cDNA 合成後に各 TCR V $\beta$  特異的プライマー (V $\beta$  1-9, 11-18, 20-24 の 22 種類) を用いて PCR 増幅を行い、DNA シーケンサーを用いて TCR V $\beta$  レパトア分布および相補性決定領域 3 (CDR3) サイズ分布解析を行った。TCR V $\beta$  8,17 については、HSCT 非施行 SSc 患者 8 名に対しても同様のプライマーおよび方法を用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得、施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

### C. 研究結果

通常CDR3のサイズ分布は6-10個のピークを持ちガウス分布に従う(図1)。HSCT施行SSc患者においては、治療前8例(66.7%)にTCR Vβレパトアに偏りが見られ、CDR3サイズではoligoclonalまたはmonoclonalな分布(skewed pattern)を示す割合が健常人より高かった。(図1)。

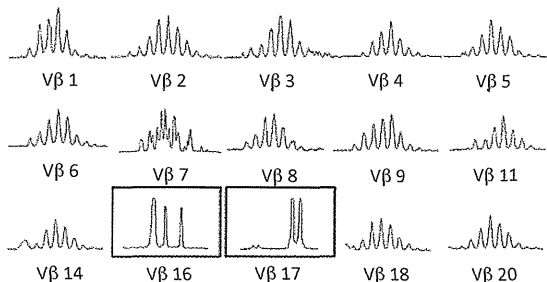
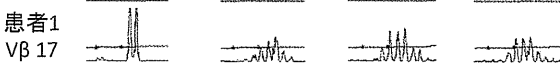


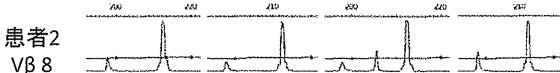
図1. CDR3サイズ分布解析の例: 症例B(自己HSCT前)  
正常では6-10個のピークをもちガウス分布に従う  
polyclonalなCDR3分布を示す  
CDR3に偏りがあると、skewed pattern (mono-oligoclonal)  
を示す □

共通のTCR Vβ(Vβ 17 5例、Vβ 8 4例)で異常を認めましたが、HSCT非施行SSc 8例(限局型6例、びまん型2例)では偏りや異常分布は見られなかった。

skewed → polyclonal (12/20, 60%)



skewed → skewed (4/20, 20%)



skewed → not detected (4/20, 20%)

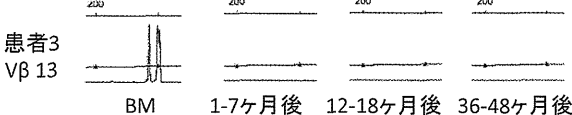


図2. skewed patternの多く(80%)は消失し、長期間維持される。BM:末梢血幹細胞採取前

CDR3のサイズ分布がskewed patternを示した20個のTCR Vβのうち12個は自己HSCT後にpolyclonal patternとなり、4個は検出されなく

なった。これらのskewed patternが消失した状態は長期間持続した。一方、4個のVβではskewed patternが長期間持続した(図2)。

健常人6名および自己HSCT後長期間検体の入手が可能であったSSc患者6例を対象にすると、自己HSCT前のSSc患者におけるTCR VβのCDR3サイズがskewed patternを示した割合は18.4%で、健常人の4.2%と比較し有意に高頻度であった。skewed patternを示した割合は自己HSCT1-7ヶ月後は5.3%と有意に低下し、その後も長期間維持された(図3)。

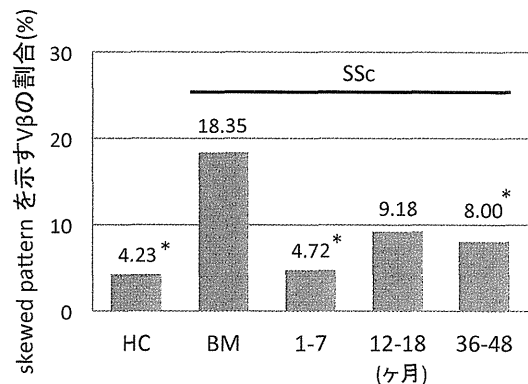


図3. 健常人およびSSc患者におけるT細胞受容体CDR3サイズ分布とHSCT後の変化 HC:健常人、BM:末梢血幹細胞動員前 \* p<0.05(vs BM)

### D. 考察

自己HSCT後のTCRレパトアの多様性の回復が長期間持続する事が明らかになり、臨床効果との関連が示唆された。TCRレパトアの多様性の回復は移植前の大量免疫抑制療法によりTCR Vβレパトアに偏りを持つT細胞集団が除去され、移植したCD34陽性細胞より、TCR Vβレパトアに偏りを有さないT細胞が新しく分化するためと考えられる。一方、一部にはVβの異常が持続する症例も認められ、移植前の大量免疫抑制療法後も生存する異常クローンの存在が疑われた。また、症例の蓄積を要するが、HSCTを必要とする重症びまん型SScに共通のTCR Vβレパトア異常が存在する

可能性が示唆された。

#### E. 結論

SScに対する自己HSCTによりTCRレパトアの多様性の回復が早期より認められると共に、長期間持続しており、高い臨床効果をもたらす一因と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Wakasaki T, Masuda M, Nihiro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Noda K, Taniyama T, Komune S, Akashi K. A critical role of c-Cbl-interacting protein of 85 kDa in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas through the ras-ERK pathway. *Neoplasia* 12:789-96, 2010
2. Shimoda S, Harada K, Nihiro H, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Kikuchi K, Nakanuma Y, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K. CX3CL1 (fractalkine): a signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 51:567-75, 2010
3. Shimoda S, Harada K, Nihiro H, Shirabe K, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Nakanuma Y, Leung P, Ansari AA, Gershwin ME, Akashi K. Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 53: 1270-81, 2011.
4. Nihiro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kikushige Y, Shima T, Noda K, Ota S, Tsuzuki H, Inoue Y, Arinobu Y, Iwasaki H, Shimoda S, Baba E, Tsukamoto H, Horiuchi T, Taniyama T, Akashi K. CIN85 is required for Cbl-mediated

regulation of antigen receptor signaling in human B cells. *Blood* 119: 2263-73, 2012.

5. Shimoda S, Tsuneyama K, Kikuchi K, Harada K, Nakanuma Y, Nakamura M, Ishibashi H, Hisamoto S, Nihiro H, Leung PS, Ansari AA, Gershwin ME, Akashi K. The role of natural killer (NK) and NK T cells in the loss of tolerance in murine primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 168: 279-284, 2012
6. Oryoji K, Kiyohara C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Nihiro H, Shimoda T, Akashi K, Yanase T. Reduced carotid intima-media thickness in systemic lupus erythematosus patients treated with cyclosporine A. *Mod Rheumatol*(in press)

##### 2. 学会発表

1. Nihiro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Noda K, Inoue Y, Arinobu Y, Akashi K: A vital role of CIN85 in Cbl-mediated regulation of B cell survival, growth and differentiation. 2010 Keystone Symposia. February 21-26, 2010, Taos, NM, USA
2. 新納宏昭、Jabbarzadeh-Tabrizi Siamak、相澤久美子、上田尚靖、押領司健介、三苫弘喜、井上靖、有信洋二郎、塚本浩、堀内孝彦、赤司浩一：ヒトB細胞におけるIRAK発現調節と自己免疫疾患におけるその関与。第54回日本リウマチ学会総会、2010年4月22-25日、神戸
3. 新納宏昭、ジャバルザデ タブリジ シアマック、大田俊一郎、野田久美子、上田尚靖、田中淳、藤健太郎、井上靖、有信洋二郎、塚本浩、堀内孝彦、赤司浩一：健常人ならびにSLE患者B細胞におけるIRAK発現とその役割 第55回日本リウマチ学会総会 2011年7

月 19 日、神戸

4. Ota S, Nihiro H, Tsuzuki H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Noda K, Inoue Y, Arinobu Y, Akashi K: Elucidation of the signaling pathways to induce human regulatory B cells (Bregs). 2011 Keystone Symposia April 15, 2011, Whistler, BC, Canada
5. 新納宏昭、ジャバルザデ タブリジ シアマック、大田俊一郎、植木尚子、野田久美子、上田尚靖、田中淳、上田彰、綾野雅宏、久本仁美、古川牧緒、井上靖、有信洋二郎、塚本浩、堀内孝彦、赤司浩一: Cbl アダプター分子 CIN85 による B 細胞機能制御と SLE 患者 B 細胞における役割 第 56 回日本リウマチ学会総会 2012 年 4 月 27 日、東京
6. 新納宏昭: 抗 BAFF 抗体、TACI-Ig 第 56 回日本リウマチ学会総会 (招待講演)、2012 年 4 月 27 日、東京
7. 大田俊一郎、新納宏昭、植木尚子、ジャバルザデ タブリジ シアマック、野田久美子、上田尚靖、田中淳、上田彰、久本仁美、綾野雅宏、古川牧緒、井上靖、有信洋二郎、塚本浩、堀内孝彦、赤司浩一: 健常人ならびに SLE 患者における制御性 B 細胞の比較検討 第 56 回日本リウマチ学会総会、2012 年 4 月 27 日、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業  
(免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業)  
総合分担研究報告書

全身性硬化症における自己造血幹細胞移植後の免疫学的再構築の検討、  
および DNAM-1 の発現と病態との関連に関する研究

研究者分担者 塚本 浩

九州大学病院 免疫・膠原病・感染症内科 助教

研究要旨

全身性硬化症(SSc)に対する自己造血幹細胞移植(自己 HSCT)の効果が長期間持続する機序を解明するため、SSc における自己 HSCT 後の免疫学的再構築の特徴を明らかにする事を目的とした。対象は CD34 純化自己 HSCT を施行した SSc11 例で、自己 HSCT 前後にフローサイトメトリーを用いて、リンパ球亜分画の実数を算出し、また Th1/Th2 バランスを測定した。T 細胞は自己 HSCT1 ヶ月後より回復したが、その大部分は CD8+T 細胞で、CD4+T 細胞の回復は自己 HSCT 後 1~6 ヶ月は著しく抑制されていた。CD4+T 細胞のうちナイーブ CD4+/CD45RA+T 細胞の回復は、メモリーCD4+/CD45RO+T 細胞の回復に比較し著しく遅延した。B 細胞は自己 HSCT12 ヶ月後に治療前値まで回復した。自己 HSCT 後 60 ヶ月間 Th1/Th2 バランスは Th1 優位が持続し、長期間にわたる有効性との関連が示唆された。共同研究者が行った遺伝子プロファイル解析において SSc 患者で高発現していた DNAM-1 について機能解析を行ったところ、SSc 患者 CD8+細胞では DNAM-1 発現が亢進していた。DNAM-1+CD8+細胞で IL-13 産生細胞が有意に多かった。CD8+T 細胞と HUVEC の共培養に抗 DNAM-1 阻害抗体を加えると HUVEC の細胞死が部分的に抑制された。DNAM-1 陽性 CD8+T 細胞は血管内皮細胞障害や向線維化サイトカイン IL-13 の産生を介して SSc の病態に関与していると考えられた。

A. 研究目的

全身性硬化症(SSc)に対する自己造血幹細胞移植(自己 HSCT)の効果が長期間持続する事が明らかになったが、その機序については不明の点も多い。本研究では有効性の機序を解明するため、SSc における自己 HSCT 後の免疫学的再構築を明らかにする事を目的とした。また本研究で SSc 患者と健常人を比較した遺伝子発現プロファイル分析において SSc 患者の末梢血リンパ球で高発現していた遺伝子を複数個抽出したが、この中で DNAX accessory

molecule 1 (DNAM-1, CD226)に着目し、SSc 患者末梢血リンパ球の DNAM-1 の発現と病態との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1.自己HSCT後の免疫学的再構築の検討

対象はCD34純化自己HSCTを施行したSSc11例で、内訳は男性3例女性8例、平均年齢は52.3歳である。治療開始前、自己末梢血幹細胞採取後、自己HSCT1, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60ヶ月後にフローサイトメトリーを用いて

CD3/CD19, CD4/CD8, CD4/CD45RA, CD4/CD45RO, CD4/CD25, CD19/CS27について、リンパ球亜分画の実数を算出し、またTh1/Th2バランスを測定した。

## 2. DNAM-1の発現と病態との関連

①SSc患者17例と健常者6例について末梢血リンパ球 (CD4+, CD8+, CD19+細胞) 上のDNAM-1の発現をフローサイトメトリー (FCM) にて測定した。②健常者末梢血単核球をPMA+Ionomycinで刺激後、DNAM-1陽性およびDNAM-1陰性細胞における各種サイトカインの産生およびCD107a (脱顆粒マーカー) の発現をFCMにて比較した。③健常者末梢血から分離したCD8+T細胞をヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と、抗DNAM-1阻害抗体存在下または非存在下にて共培養し細胞傷害活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得、施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

## C. 研究結果

### 1. 自己HSCT後の免疫学的再構築の検討

T細胞は自己HSCT1ヶ月後より回復したが、その大部分はCD8+T細胞で、CD4+T細胞の回復は自己HSCT後1~36ヶ月は著しく抑制され、48ヶ月後以降CD4/CD8比は1前後までに回復した(図1. 治療開始前は1.7)。B細胞は自己HSCT12ヶ月後に治療前値まで回復した。B細胞亜分画では治療前よりメモリーCD27+B細胞に比しナイーブCD27-B細胞が多かったが、自己HSCT60ヶ月後もCD27+メモリーB細胞の増加は認められなかった。Th1/Th2バランスは自己HSCT1ヶ月後より有意に上昇後、6ヶ月後にピークとなりその後

60ヶ月後までTh1優位が持続した(図2)。

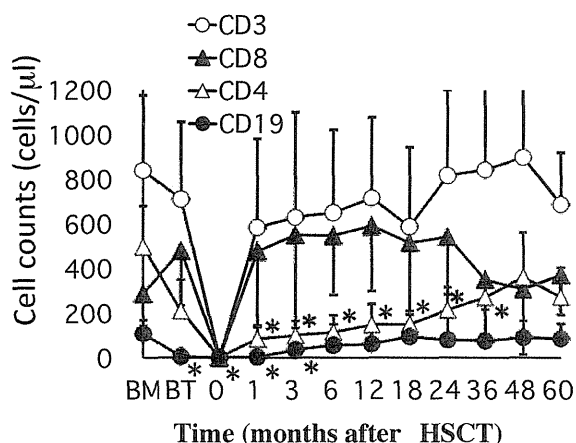


図1. 自己HSCT後の免疫学的再構築  
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前  
\*P<0.05 vs BM(ベースライン)

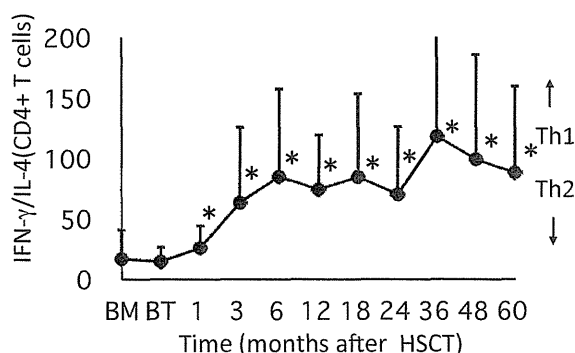


図2.Th1/Th2バランスの推移  
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前  
\*P<0.05 vs BM(ベースライン)

### 2. DNAM-1の発現と病態との関連

①SSc患者のCD8+細胞ではDNAM-1陽性率が有意に高かった(82.6% vs 71.3%, p=0.0316)。CD8+細胞上のDNAM-1発現量(MFI)は抗Scl-70抗体陽性および間質性肺炎合併SScで高く、%VCと負の相関を認めた。②DNAM-1+CD8+細胞でIL-13産生細胞が有意に多かった(4.9±1.7倍、p=0.0007)。③CD8+T細胞とHUVECの共培養に抗DNAM-1阻害抗体を加えるとHUVECの細胞死が部分的に抑制された。



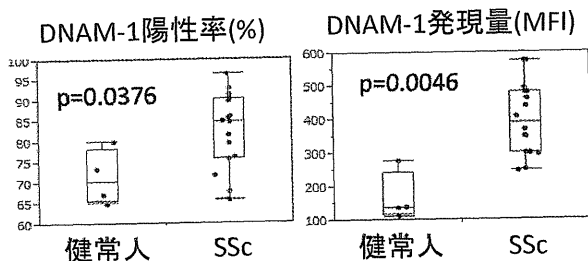


図3. 健常人及びSSc患者CD8+T細胞におけるDNAM-1陽性率および発現量の比較

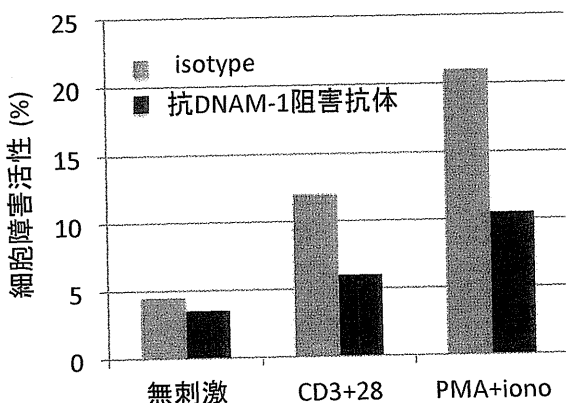


図4. 抗DNAM-1阻害抗体により、ヒト臍帯静脈内皮細胞に対する細胞障害活性は部分的に抑制される

#### D. 考察

多発性硬化症ではナイーブCD4+/CD45RA+T細胞優位な回復が疾患の改善と相関していたとの報告があるが、本研究ではメモリーCD4+/CD45RO+T細胞が優位に回復していた。SScではメモリーB細胞数の低下が指摘されているが、自己HSCT60ヶ月後でもメモリーB細胞数の増加は認められず、B細胞亜分画の異常は是正されなかった。IFN- $\gamma$ は抗線維化作用、一方IL-4は線維化促進作用を有し、また、SScのモデルマウスであるタイトスキンマウスにおいてTh1主体の免疫反応の誘導による皮膚硬化の抑制が報告されている。以上より、本研究における自己HSCT後のTh1優位のCD4+T細胞の回復とSScの皮膚硬化の改善との関連が推察される。

DNAM-1は免疫グロブリンスーパーファミリー

一に属するI型膜糖蛋白でT細胞、単球、NK細胞等に発現し、接着分子としての機能を有するが、近年DNAM-1はSScなど多くの自己免疫疾患における疾患感受性遺伝子として注目されている。我々はSSc患者CD8+細胞ではDNAM-1発現が亢進していることを初めて明らかにした。DNAM-1陽性CD8+T細胞は血管内皮細胞障害や向線維化サイトカインIL-13の産生を介してSScの病態に関与していると考えられた。

#### E. 結論

SScに対する自己HSCT後60ヶ月間Th1/Th2バランスはTh1優位が持続し、長期間にわたる有効性との関連が示唆された。DNAM-1陽性CD8+T細胞は血管内皮細胞障害や向線維化サイトカインIL-13の産生を介してSScの病態に関与していると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Kimoto Y, Horiuchi T, Tsukamoto H, Kiyohara C, Mitoma H, Uchino A, Furugo I, Yoshizawa S, Ueda A, Harashima S, Sawabe T, Tahira T, Hayashi K, Yoshizawa S, Shimoda T, Akashi K, Harada M. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL5 with systemic lupus erythematosus and accompanying infections. *Rheumatology* 49:1346-53, 2010
- Uchino A, Tsukamoto H, Nakashima H, Yoshizawa S, Furugo I, Mitoma H, Oryoji K, Shimoda T, Niuro H, Tada Y, Yano T, Nonaka T, Oishi R, Akashi K, Horiuchi T. Tacrolimus is effective for lupus nephritis patients with

- persistent proteinuria. Clin Exp Rheumatol 28:6-12, 2010
3. Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Niiro H, Arinobu Y, Inoue Y, To K, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Harada M, Akashi K. Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells. Rheumatology 50: 944-52, 2011
  4. Yabuuchi H, Matsuo Y, Tsukamoto H, Sunami S, Kamitani T, Sakai S, Hatakenaka M, Nagafuji K, Horiuchi T, Harada M, Akashi K, Honda H. Correlation between pretreatment or follow-up CT findings and therapeutic effect of autologous peripheral blood stem cell transplantation for interstitial pneumonia associated with systemic sclerosis. Eur J Radiol 79:e74-79, 2011.
  5. Tanaka A, Tsukamoto H, Mitoma H, Kiyohara C, Ueda N, Ayano M, Ohta SI, Inoue Y, Arinobu Y, Niiro H, Horiuchi T, Akashi K. Serum progranulin levels are elevated in patients with systemic lupus erythematosus, reflecting disease activity. Arthritis Res Ther 14: R244, 2012.
  6. Ueda N, Tsukamoto H, Mitoma H, Ayano M, Tanaka A, Ohta S, Inoue Y, Arinobu Y, Niiro H, Akashi K, Horiuchi T. The Cytotoxic Effects of Certolizumab Pegol and Golimumab Mediated by Transmembrane Tumor Necrosis Factor alpha. Inflamm Bowel Dis 19: 1224-1231, 2013.
  7. Oshima Y, Tsukamoto H, Tojo A. Association of hepatitis B with antirheumatic drugs: a case-control study. Mod Rheumatol(in press)
2. 学会発表
    1. Tsukamoto H, Horiuchi T, Miyamoto T, Niiro H, Harada M, Akashi K: Autologous hematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis : long-term follow-up analysis of immune reconstitution. Annual European Congress of Rheumatology. June 15-18, 2010, Rome, Italy.
    2. 塚本 浩、堀内孝彦、三苫弘喜、有信洋二郎、井上 靖、押領司健介、藤健太郎、相澤久美子、新納宏昭、原田実根、赤司浩一：全身性硬化症に対する大量免疫抑制療法と自己造血幹細胞移植. 第54回日本リウマチ学会総会、2010年4月22-25日、神戸
    3. Tsukamoto H, Horiuchi T, Miyamoto T, et al. CD34-selected and unmanipulated autologous hematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis. Annual European Congress of Rheumatology, May 27, 2011, London, UK.
    4. 塚本 浩、堀内孝彦、新納宏昭、他. 全身性硬化症に対する CD34 陽性細胞純化及び非純化自己造血幹細胞移植. 第55回日本リウマチ学会総会、2011年7月18-20日、神戸市
    5. Tsukamoto H, Horiuchi T, Miyamoto T, Niiro H, Arinobu Y, Inoue Y, Ayano M, Tanaka A, Ueda N, Harada M, Akashi K. Long-term follow-up of autologous hematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis. Annual European Congress of Rheumatology, June

5-8, 2012, Berlin, Germany.

6. 塚本 浩、堀内孝彦、綾野雅宏、他. 全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植の長期成績. 第 56 回日本リウマチ学会総会、2012 年 4 月 26-28 日、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K.	TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells.	Cell Stem Cell	7	708-717	2010
Asakura S, Hashimoto D, Takashima S, Sugiyama H, Maeda Y, Akashi K, Tanimoto M, Teshima T.	Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces graft-versus-leukemia effects in mice.	J Clin Invest	120	2370-2378	2010
Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Oshima T, Tomizuka K, Akashi K, Teshima T.	The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells.	J Exp Med	208	285-294	2011
Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Niuro H, Arinobu Y, Inoue Y, To K, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Harada M, Akashi K.	Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells.	Rheumatology	50	944-952	2011

氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niuro H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K.	Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia.	Cancer Cell	20	246-259	2011
Yabuuchi H, Matsuo Y, Tsukamoto H, Sunami S, Kamitani T, Sakai S, Hatakenaka M, Nagafuji K, Horiuchi T, Harada M, Akashi K, Honda H.	Correlation between pretreatment or follow-up CT findings and therapeutic effect of autologous peripheral blood stem cell transplantation for interstitial pneumonia associated with systemic sclerosis.	Eur J Radiol	79	E74-79	2011
Ferrara JL, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, Levine JE, Choi SW, Huber E, Landfried K, Akashi K, Vander Lugt M, Reddy P, Chin A, Zhang Q, Hanash S, Paczesny S.	Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease.	Blood	118	6702-6708	2012
Harris AC, Ferrara JL, Braun TM, Holler E, Teshima T, Levine JE, Choi SW, Landfried K, Akashi K, Lugt MV, Couriel DR, Reddy P, Paczesny S.	Plasma biomarkers of lower gastrointestinal and liver acute GVHD.	Blood	119	2960-2963	2012

氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nihiro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kikushige Y, Shima T, Noda K, Ota S, Tsuzuki H, Inoue Y, Arinobu Y, Iwasaki H, Shimoda S, Baba E, Tsukamoto H, Horiuchi T, Taniyama T, Akashi K.	CIN85 is required for Cbl-mediated regulation of antigen receptor signaling in human B cells.	Blood	119	2263-2273	2012
Kuriyama T, Takenaka K, Kohno K, Yamauchi T, Daitoku S, Yoshimoto G, Kikushige Y, Kishimoto J, Abe Y, Harada N, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K.	Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis.	Blood	120	4058-4067	2012
Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H, Shimoda S, Iwasaki H, Shimono N, Ayabe T, Akashi K, Teshima T.	Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of $\alpha$ -defensins.	Blood	120	223-231	2012

	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Niiro H, Iino T, Endo S, Kawano Y, Komohara Y, Takeya M, Hata H, Okada S, Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H, Okuno Y.	PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells.	Blood	121	962-970	2012
Harada A, Okada S, Konno D, Odawara J, Yoshimi T, Yoshimura S, Kumamaru H, Saiwai H, Tsubota T, Kurumizaka H, Akashi K, Tachibana T, Imbalzano AN, Ohkawa Y.	Chd2 interacts with H3.3 to determine myogenic cell fate.	EMBO J	31	2994-3007	2012
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
Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Henzan H, Numata A, Ito Y, Takenaka K, Iwasaki H, Kamimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K.	Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.	Blood	121	840-848	2013



氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukata M, Ishikawa F, Najima Y, Yamauchi T, Saito Y, Takenaka K, Miyawaki K, Shimazu H, Shimoda K, Kanemaru T, Nakamura K, Odashiro K, Nagafuji K, Harada M, Akashi K.	Contribution of bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cells to the generation of donor-marker(+) cardiomyocytes in vivo.	PLoS One	8	e62506	2013

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# TIM-3 Is a Promising Target to Selectively Kill Acute Myeloid Leukemia Stem Cells

Yoshikane Kikushige,<sup>1</sup> Takahiro Shima,<sup>1</sup> Shin-ichiro Takayanagi,<sup>2</sup> Shingo Urata,<sup>1</sup> Toshihiro Miyamoto,<sup>1</sup> Hiromi Iwasaki,<sup>1</sup> Katsuto Takenaka,<sup>1</sup> Takanori Teshima,<sup>1</sup> Toshiyuki Tanaka,<sup>3</sup> Yoshimasa Inagaki,<sup>2</sup> and Koichi Akashi<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicine and Biosystemic Sciences, Kyushu University Graduate School of Medicine, Fukuoka 812-8582, Japan

<sup>2</sup>Innovative Drug Research Laboratories Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Tokyo 194-8538, Japan

<sup>3</sup>School of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences, Kobe 650-8530, Japan

\*Correspondence: akashi@med.kyushu-u.ac.jp

DOI 10.1016/j.stem.2010.11.014

## SUMMARY

Acute myeloid leukemia (AML) originates from self-renewing leukemic stem cells (LSCs), an ultimate therapeutic target for AML. Here we identified T cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3) as a surface molecule expressed on LSCs in most types of AML except for acute promyelocytic leukemia, but not on normal hematopoietic stem cells (HSCs). TIM-3<sup>+</sup> but not TIM-3<sup>-</sup> AML cells reconstituted human AML in immunodeficient mice, suggesting that the TIM-3<sup>+</sup> population contains most, if not all, of functional LSCs. We established an anti-human TIM-3 mouse IgG2a antibody having complement-dependent and antibody-dependent cellular cytotoxic activities. This antibody did not harm reconstitution of normal human HSCs, but blocked engraftment of AML after xenotransplantation. Furthermore, when it is administered into mice grafted with human AML, this treatment dramatically diminished their leukemic burden and eliminated LSCs capable of reconstituting human AML in secondary recipients. These data suggest that TIM-3 is one of the promising targets to eradicate AML LSCs.

## INTRODUCTION

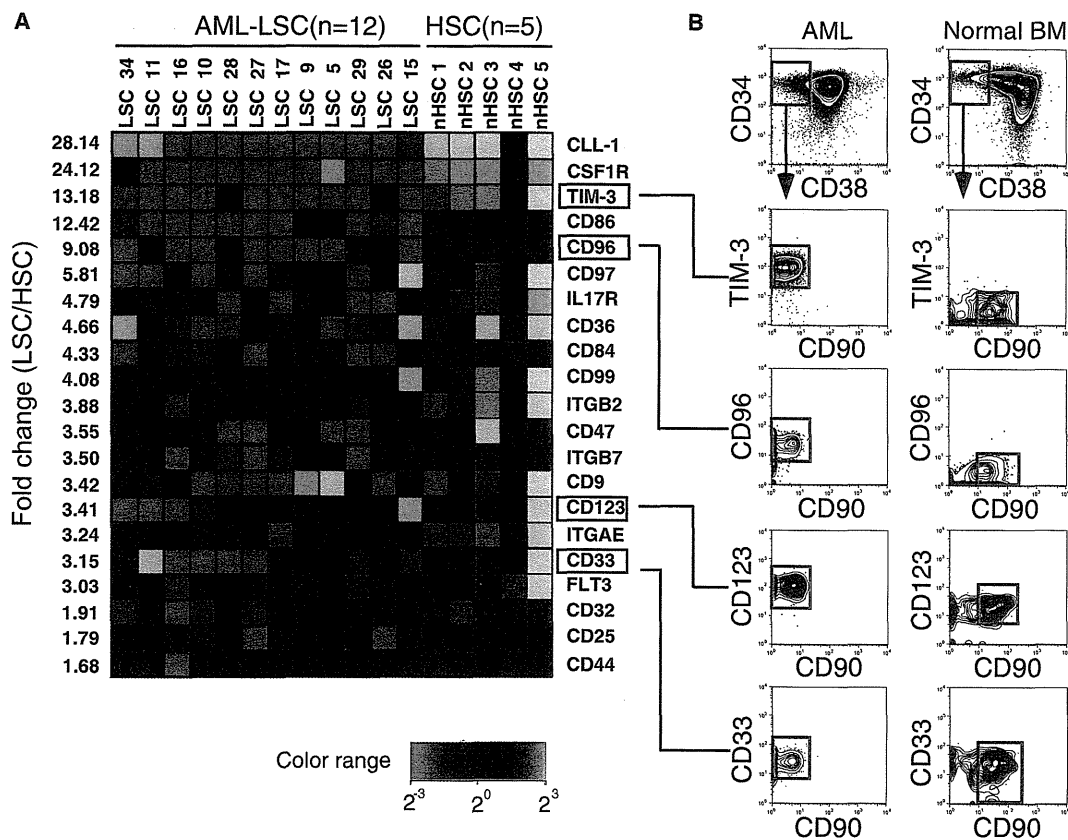
Acute myeloid leukemia (AML) is a clonal malignant disorder derived from a small number of leukemic stem cells (LSCs). LSCs self renew and generate leukemic progenitors that actively divide to produce a large number of immature clonogenic leukemic blasts (Bonnet and Dick, 1997; Hope et al., 2004; Lapidot et al., 1994). This hierarchical stem cell-progenitor-mature cell relationships in AML appears to simulate normal hematopoiesis that originates from hematopoietic stem cells (HSCs) with self-renewal activity. We have shown that like normal HSCs, AML LSCs are quiescent in vivo and appear to reside at the endosteal "osteoblastic" niche in the bone marrow based on our analysis in a xenograft model (Ishikawa et al., 2007). AML LSCs are resistant to chemotherapeutic reagents that usually target cycling malignant cells. In the majority (~90%) of AML patients, the conventional chemotherapies can diminish the leukemic clones to achieve remission. However,

~60% of such remission patients still relapse, and the recurrence of AML in these patients should originate from LSCs that survive the intensive chemotherapies. Therefore, the LSC should be the ultimate cellular target to cure human AML.

To eradicate the AML LSC without killing normal HSCs, it is critical to isolate a molecule that is expressed or functions specifically at the AML LSC stage (Krause and Van Etten, 2007). It has been shown that the AML LSCs mainly reside within the CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> fraction of leukemic cells and can reconstitute human AML in immunodeficient mice (Lapidot et al., 1994), although recent studies have suggested that LSCs can exist also in CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (Taussig et al., 2008) or CD34<sup>-</sup> blastic fractions at least in some types of AML (Martelli et al., 2010; Taussig et al., 2010). Normal HSCs with long-term reconstitution activity also have the CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> phenotype (Bhatia et al., 1997; Ishikawa et al., 2005). However, the expression pattern of other surface molecules in the CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> fraction of AML cells is different from that of normal controls. For example, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML cells possess many phenotypic characteristics analogous to normal granulocyte/macrophage progenitors (GMPs) (Yoshimoto et al., 2009). Previous studies have reported molecules preferentially expressed in AML cells. Such molecules include CLL-1 (van Rhenen et al., 2007), CD25, CD32 (Saito et al., 2010), CD33 (Florian et al., 2006; Hauswirth et al., 2007), CD44 (Florian et al., 2006; Jin et al., 2006), CD47 (Jaiswal et al., 2009; Majeti et al., 2009), CD96 (Hosen et al., 2007), and CD123 (Jin et al., 2009; Yalcintepe et al., 2006). However, in our hands, some of these molecules are expressed in LSCs at a level insufficient for clear distinction, are expressed also in normal HSCs at a considerable level, or are found only in a fraction of AML cases. It is therefore critical to isolate ideal targets for AML LSCs with sufficient specificity and sensitivity.

Here we report a new surface molecule that might be useful to eradicate AML LSCs leaving normal HSC intact. We performed differential transcriptional profiling of AML LSCs and HSCs and extracted the T cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3) as a promising AML LSC-specific target surface molecule. TIM-3 is originally found as a surface molecule expressed in CD4<sup>+</sup> Th1 lymphocytes in mouse hematopoiesis and is an important regulator of Th1 cell immunity and tolerance induction (Monney et al., 2002; Sabatos et al., 2003; Sánchez-Fueyo et al., 2003). Murine TIM-3 is also expressed in CD11b<sup>+</sup> macrophages and CD11c<sup>+</sup> dendritic cells and recognizes apoptotic cells' phosphatidylserine through its IgV domain to mediate phagocytosis (Nakayama et al., 2009).

We found that human TIM-3 was expressed in the vast majority of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> LSCs and CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> leukemic progenitors in AML of most FAB types, except for acute



**Figure 1. The Expression of LSC-Specific Surface Molecules in AML**

The CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> adult bone marrow HSCs and CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML LSCs were purified and tested for their surface molecule expression.

(A) Results of cDNA microarray analysis of HSCs and AML LSCs. Representative genes coding surface molecules that are expressed highly in AML LSCs are shown. TIM-3 is expressed specifically in LSCs at high levels in the majority of AML patients. Patient numbers correspond to those in Table S1.

(B) The expression of representative surface proteins in HSCs and AML LSCs on FACS.

promyelocytic leukemia (M3). TIM-3 was not expressed in CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> normal HSCs or the vast majority of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> normal progenitors. Administration of anti-human TIM-3 mouse antibodies with a complement-dependent cytotoxicity (CDC) and an antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) selectively inhibited engraftment and development of human AML in xenograft models. Our data strongly suggest that the use of TIM-3 to target AML LSCs is a promising approach for the improvement of leukemia therapy.

**RESULTS**

**TIM-3 Is Expressed in the CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Fraction of AML Patients' Bone Marrow Cells**

In most types of AML, LSCs are concentrated in the CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> fraction of AML cells (Ishikawa et al., 2007; Lapidot et al., 1994), whose phenotype is common to normal adult HSCs. Patients' characteristics are shown in Table S1 available online. To search for the AML LSC-specific molecules, 10,000 each of purified CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML cells and CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> normal HSCs were subjected to cDNA microarray analysis. We extracted 256 genes with >4-fold change between normal

HSCs and CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML cells and then selected 197 differentially expressed genes with <0.01 of a cut-off p value (Table S2). Genes coding surface molecules that are expressed highly in CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML cells were selected for this study. Figure 1A shows the mRNA levels of candidate LSC-specific surface molecules in purified CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML cells and normal HSCs. The molecules expressed in CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML cells at levels >8-fold higher as compared to normal HSCs included TIM-3 and previously identified LSC-specific molecules such as CLL-1 (van Rhenen et al., 2007), CSF1R (Aikawa et al., 2010), and CD96 (Figure 1A; Hosen et al., 2007). As shown in Figure 1B, TIM-3 protein was highly expressed in CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML cells but not in normal HSCs. We focused on TIM-3 not only because it is expressed specifically in CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML cells at high levels, but also because it is expressed in the majority of patients with most AML types.

We evaluated the TIM-3 protein expression on cell surface of AML cells by FACS analysis. As shown in Figure 2, the vast majority of the CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> LSCs as well as CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> progenitor fractions in AML M0, M1, M2, and M4 types expressed TIM-3 at a high level in virtually all cases studied. In AML M5, M6, and M7, a considerable fraction of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells