

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09475

研究課題名(和文) 表面抗原ESAMを指標とした造血幹細胞の活性化を誘導する分子機構の同定と臨床応用

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanisms activating hematopoietic stem cells by monitoring expression levels of a new stem-cell marker ESAM

研究代表者

横田 貴史 (Takafumi, Yokota)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60403200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は血管内皮抗原endothelial cell selective adhesion molecule (ESAM)が、ヒトにおいて造血幹細胞の表面マーカーとして有用であることを報告し、正常造血幹細胞におけるESAMの機能解析を行ってきた。本研究ではESAMの発現変化を指標として造血幹細胞の活性化を制御する分子機構を解析し、造血器悪性腫瘍の新しい診断・治療法の開発に展開することを目標とした。初発のヒト急性骨髄性白血病症例の多くが白血病芽球にESAMを発現していること、白血病細胞の質的変動によってESAMの発現が変化すること、この分子機構に自己分泌性のTGF $\beta$ が関連していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that the endothelial-cell selective adhesion molecule (ESAM) is an important marker of HSCs in humans. In the present study, we have exploited ESAM expression levels as an index to analyze the molecular mechanisms regulating the status of hematopoietic stem cells, and have applied findings to develop new strategies for diagnosis and treatment of human acute leukemia. Our study has revealed that many of human acute myeloid leukemia cases highly expressed ESAM on their tumor cells. We also found that leukemia stem cells (LSCs) represent ESAM expression, of which levels are heterogeneous and are fluctuating at single cell levels according to the proliferating status of LSCs. The TGF $\beta$  signaling pathway is autonomously involved in inducing heterogeneity in ESAM expression in the LSC population. The fluctuation is thought to confer certain benefits to LSCs, such as drug resistance and promoting invasiveness.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞 白血病幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄には、血液細胞以外に幹細胞・骨芽細胞・脂肪細胞・血管内皮細胞など多様な間葉系細胞が存在し、造血を調節する微小環境を構築している。骨髄において造血幹細胞は、“造血幹細胞ニッチ”と呼ばれる特有の微小環境に存在し、体全体からの要求に応じて、静止状態と自己複製的増殖あるいは成熟分化のバランスが精巧に調節されている。

近年、急性骨髄性白血病を始めとする多くの腫瘍において癌幹細胞の存在が示されている。白血病における幹細胞は“白血病幹細胞”と呼ばれ、正常造血幹細胞から競合的にニッチを奪い取り、造血を抑制することが示されている。このことは、白血病幹細胞が正常造血幹細胞と同様の微小環境を住み家とし、ある程度共通したメカニズムで増殖シグナルを受けることを推測させる。従って、造血幹細胞の生理的特性を理解するためだけでなく、白血病に対する新たな治療戦略の開発においても、造血幹細胞と造血微小環境の相互作用の解析は極めて重要である。

申請者は、これまで骨髄間葉系細胞と造血幹細胞の相互作用について継続的な解析を行い、新規分子の同定を含む多くの研究成果を報告してきた(Blood 1998, Blood 1999, Blood 2000, Nat Med 2000, J Clin Invest 2002, J Immunol 2003, Exp Hematol 2007, Exp Hematol 2008, J Immunol 2008)。独自の手法として、早期リンパ球前駆細胞と多能性造血幹細胞を分離する方法を確立した(Yokota et al. Immunity 2003)。この方法を用いて分離した造血幹細胞と早期リンパ球前駆細胞の発現遺伝子を比較解析し、新規造血幹細胞マーカーとして血管内皮関連抗原 endothelial-cell selective adhesion molecule (ESAM)を同定した(Blood 2009)。

継続した研究で、ESAMの造血幹細胞マーカーとしての意義だけでなく、造血幹細胞における機能においても重要であることを明らかにした。造血幹細胞のESAM発現レベルが、5-FU投与や放射線照射後に著明に上昇するという発見を起点に研究を進め、ESAMが緊急時に活性化した造血幹細胞において重要な役割を担っていること、特に赤血球造血の回復に必須であることを見出した(Sudo et al. JI 2012, 2017)。また従来、マウスとヒトで造血幹細胞の表面抗原が大きく異なることが、造血幹細胞に関する基礎研究の成果をヒトの臨床医療へ展開する上で障壁になっていたが、ESAMはヒト造血幹細胞の純化にも応用できるという重要な知見が得られていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、ESAMの発現変化を指標として、造血幹細胞の活性化を制御する分子機構を明らかにすることを第1の目標とした。次にヒト白血病細胞におけるESAMの発現を解析し、ヒト造血器悪性腫瘍の新しい診断・

治療法の開発に展開することを第2の目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 造血幹細胞の活性化を誘導する分子機構の解析

本研究の予備データとして、造血幹細胞のESAM発現レベルが、5-FU投与や放射線照射による骨髄抑制からの回復期に、造血幹細胞の増殖亢進に伴って著明に上昇し、造血の安定期には通常に戻る事が分かっていた。また、造血幹細胞の増殖を支持する能力を持つ間葉系細胞株の上で造血幹細胞を培養した場合には、能力を持たない細胞株の上で培養した場合と比較して、ESAMの発現が上昇することを見出していた。造血幹細胞増幅能力の異なる間葉系細胞間の遺伝子発現の違いと、異なる間葉系細胞上で培養した造血幹細胞間の遺伝子発現の違いを、それぞれマイクロアレイ法にて網羅的に解析することにより、造血幹細胞活性化に必要な分子と、その分子からの増殖シグナルの候補を見出す。さらに、野生型マウスとESAMノックアウトマウスに5-FUを投与し、回復期の造血幹細胞を採取して遺伝子発現の相違を解析する。野生型で有意に高発現する遺伝子と、間葉系細胞との共培養で増殖が誘導された造血幹細胞において高発現する遺伝子の共通項を調べ、細胞内シグナル伝達系の候補を絞り込む。

### (2) 造血幹細胞の増殖活性化分子およびシグナルの検証

間葉系細胞の比較から得られた造血幹細胞増殖を誘導する可能性のある候補分子の発現を、siRNAなどを用いて抑制することにより、造血幹細胞のESAM発現と増殖が低下するかどうかを検討する。また反対に、絞り込んだ候補分子を造血幹細胞増幅能力の低い間葉系細胞に高発現させ、造血幹細胞の増殖を支持する能力が亢進するかどうかを検討する。

### (3) ヒト白血病細胞におけるESAMの機能解析と新しい診断・治療法への展開

ヒト白血病細胞株やプライマリーの急性骨髄性白血病症例の細胞において、ESAMの発現を確認できている。さらに症例を蓄積し、各種ヒト白血病の病型とESAMの発現に関するデータを集積して、白血病細胞の系統診断への応用を行う。

ESAMの発現レベルは、ヒト骨髄性白血病においても活発な増殖能を反映している可能性が高い。ESAM発現が白血病細胞においてどのように機能するのかを評価するため、ESAM陰性・陽性細胞をそれぞれ分離して増殖能力を調べ、発現遺伝子の比較をRNA-seqを用いて行う。また、ESAM陽性白血病細胞に、検討で明らかとなった造血幹細胞活性化シグナルを阻害する操作を加えることにより、ESAMの発現低下と増殖能の抑制が得られるかを

in vitro, in vivo の実験で確認する。

#### 4. 研究成果

マウス正常造血幹細胞を用いた実験で ESAM の発現量はその活性化を正確に反映すること、TGFβ シグナル系が造血幹細胞の増殖を静止期へと誘導するのと併行して ESAM の発現を陰性化させることを明らかにした。

ヒト急性白血病細胞の解析を行い、初発のヒト急性骨髄性白血病症例において、約3分の2の症例で白血病芽球が ESAM を発現していることを明らかにした。急性リンパ球性白血病では検討した範囲ですべて ESAM 陰性であったことから、ESAM の発現は白血病細胞の系統診断に応用できることがわかった。

さらにヒト急性骨髄性白血病細胞株を用いて、ESAM 発現の意義について解析を行った。ヒト骨髄性白血病細胞株 KG1a および CMK では、同一クローンである白血病細胞において ESAM 発現レベルに 1000 倍以上の差が認められた。興味深いことに、ESAM 高発現細胞が高い増殖能力を示したが、ESAM 高発現および ESAM 低発現分画のいずれの細胞集団も、継続培養によって親株と同じ不均一な ESAM の発現を呈する集団を再構成することが分かった。さらに CD34+CD38-KG1a を ESAM 高発現・低発現の単一細胞を分離し培養したところ、いずれにおいても自己複製能をもつ細胞が存在し、継続培養により ESAM を不均一に発現する親株と同じ集団を再構成する結果を得た。これらの結果から、急性骨髄性白血病の白血病幹細胞は細胞学的に不均一性を持ち、個々の細胞レベルで質的に変化しながら存在していることが明らかとなった。さらに白血病細胞の質的変動には自己分泌性の TGFβ が関連していること、このシグナル系を阻害することによってヒト骨髄性白血病細胞株 KG1a に細胞死を誘導できることを見出した。

#### 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8件)

1. Ishibashi T, Yokota T, Satoh Y, Ichii M, Sudo T, Doi Y, Ueda T, Nagate Y, Hamanaka Y, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y.

Identification of MS4A3 as a reliable marker for early myeloid differentiation in human hematopoiesis.

Biochem Biophys Res Commun. 495: 2338-2343, 2018.

doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.117.

査読有

#### 2. 横田貴史

リンパ球造血に関する最近の知見

実験医学 35:3063-3070、2017 羊土社

査読無

#### 3. 横田貴史、金倉 謙

急性リンパ性白血病の遺伝子異常  
血液内科 74:103-108, 2017.

査読無

#### 4. Yokota T, Kanakura Y.

Genetic abnormalities associated with acute lymphoblastic leukemia.

Cancer Science 107:721-725, 2016.

doi:10.1111/cas.12927

査読有

#### 5. Sudo T, Yokota T, Okuzaki D, Ueda T, Ichii M, Ishibashi T, Isono T, Habuchi Y, Oritani K, Kanakura Y.

Endothelial cell-selective adhesion molecule expression in hematopoietic stem/progenitor cells is essential for erythropoiesis recovery after bone marrow injury.

PLoS One 11:e0154189, 2016

doi:10.1371/journal.pone.0154189

査読有

#### 6. Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M, Sudo T, Satoh Y, Doi Y, Ueda T, Tanimura A, Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y.

ESAM is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias.

Experimental Hematology 44:269-281,

2016. doi:10.1016/j.exphem.2015.12.010

査読有

#### 7. Sudo T, Yokota T, Kanakura Y.

Role of endothelial antigen ESAM in activated hematopoietic stem cells.

Rinsho Ketsueki 56:464-474, 2015.

査読有

#### 8. Fujita N, Ichii M, Maeda T, Saitoh N, Yokota T, Yamawaki K, Kakitani M, Tomizuka K, Oritani K, Kanakura Y.

Identification of osteoblast stimulating factor 5 as a negative regulator in the B-lymphopoietic niche.

Experimental Hematology 43(11):963-973,

2015. doi: 10.1016/j.exphem.2015.07.002.

査読有

[学会発表](計14件)

#### 1. 第46回日本免疫学会学術集会

Yukiko Doi, Takafumi Yokota, Tomohiko Ishibashi, Yusuke Satoh, Michiko Ichii, Akira Tanimura, Sachiko Ezoe, Hirohiko Shibayama, Kenji Oritani, Yuzuru Kanakura.

SATB1 expression is useful to identify the

lymphoid-lineage-biased trajectory of functionally fluctuating hematopoietic stem cells.

2017.12.12-14 (発表日 12.12), 仙台国際センター, 仙台, 烏山 一  
口演

2. 第 46 回日本免疫学会学術集会

Takao Sudo, Takafumi Yokota, Yuzuru Kanakura, Masaru Ishii.

Stressed microenvironment induced by 5-FU promotes the proliferation of HSPC in bone marrow.

2017.12.12-14 (発表日 12.12), 仙台国際センター, 仙台, 烏山 一  
口演

3. The American Society of Hematology 59th Annual Meeting

Tomoaki Ueda, Takafumi Yokota, Yasuhiro Shingai, Yukiko Doi, Tomohiko Ishibashi, Takao Sudo, Akira Tanimura, Michiko Ichii, Sachiko Ezoe, Hirohiko Shibayama, Kenji Oritani, and Yuzuru Kanakura.

Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule (ESAM) plays important roles in the adult-type hemoglobin synthesis during fetal erythropoiesis.

2017.12.9-12 (発表日 12.9), Georgia World Congress Center, Atlanta, USA, Anderson KC. Poster

4. The American Society of Hematology 59th Annual Meeting

Yasuhiro Shingai, Takafumi Yokota, Tomoaki Ueda, Yukiko Doi, Tomohiko Ishibashi, Akira Tanimura, Michiko Ichii, Sachiko Ezoe, Hirohiko Shibayama, Kenji Oritani, Yuzuru Kanakura.

Variable Expression Levels of the Hematopoietic Stem Cell Surface Antigen ESAM Depict Heterogeneity and Fluctuations in Leukemic Stem Cells.

2017.12.9-12 (発表日 12.9), Georgia World Congress Center, Atlanta, USA, Anderson KC. Poster

5. 第 79 回日本血液学会学術集会

新開泰宏, 横田貴史, 上田智朗, 土居由貴子, 石橋智彦, 谷村 朗, 一井倫子, 江副 幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓  
造血幹細胞表面抗原 ESAM を用いた白血病幹細胞の不均一性とゆらぎの解析

2017.10.20-22 (発表日 10.21), 東京国際フォーラム, 東京, 木崎昌弘  
口演

6. The American Society of Hematology 58th Annual Meeting

Tomoaki Ueda, Takafumi Yokota, Yasuhiro

Shingai, Yukiko Doi, Tomohiko Ishibashi, Takao Sudo, Yasuhiro Nagate, Akira Tanimura, Masahiro Tokunaga, Jiro Fujita, Michiko Ichii, Sachiko Ezoe, Hirohiko Shibayama, Kenji Oritani, and Yuzuru Kanakura.

Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule (ESAM) Is Required for the Ontogeny of Definitive Hematopoietic System in Mice.

2016.12.3-6 (発表日 12.5) San Diego, California, USA, Charles S. Abrams, MD. Poster

7. The American Society of Hematology 58th Annual Meeting

Yukiko Doi, Takafumi Yokota, Yusuke Satoh, Tomoaki Ueda, Yasuhiro Shingai, Michiko Ichii, Akira Tanimura, Sachiko Ezoe, Hirohiko Shibayama, Kenji Oritani, Terumi Kohwi-Shigematsu, and Yuzuru Kanakura.

SATB1 expression helps in identification of the lymphoid-lineage-biased trajectory of functionally fluctuating hematopoietic stem cells.

2016.12.3-6 (発表日 12.4) San Diego, California, USA, Charles S. Abrams, MD. Oral

8. 第 78 回日本血液学会学術集会

Yukiko Doi, Takafumi Yokota, Tomohiko Ishibashi, Yusuke Satoh, Michiko Ichii, Akira Tanimura, Sachiko Ezoe, Hirohiko Shibayama, Kenji Oritani, and Yuzuru Kanakura.

SATB1 expression marks lymphoid-lineage-biased hematopoietic stem cells in mouse bone marrow.

2016.10.13-15 (発表日 10.15), パシフィコ横浜, 神奈川, 三谷絹子.  
口演 (英語)

9. 第 78 回日本血液学会学術集会

土居由貴子, 横田貴史, 石橋知彦, 佐藤友亮, 一井倫子, 谷村 朗, 江副幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓

SATB1 expression marks lymphoid-lineage-biased hematopoietic stem cells in mouse bone marrow.

2016.10.13-15 (発表日 10.14), パシフィコ横浜, 神奈川, 三谷絹子.  
口演

10. 第 78 回日本血液学会学術集会

上田智明, 横田貴史, 土居由貴子, 石橋知彦, 数藤孝雄, 谷村 朗, 徳永正浩, 一井倫子, 江副幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓

ESAM is required for the ontogeny of definitive hematopoietic system in mice.

2016.10.13-15 (発表日 10.13), パシフィ  
コ横浜, 神奈川, 三谷絹子.  
ポスター

11. 第 78 回日本血液学会学術集会  
石橋知彦, 横田貴史, 田中宏和, 一井倫子,  
数藤孝雄, 佐藤友亮, 土居由貴子, 上田智  
明, 新開泰宏, 谷村 朗, 濱中有理, 江副  
幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓  
Endothelial antigen ESAM is a human HSC  
marker associated with a subset of human  
leukemias.

2016.10.13-15 (発表日 10.13), パシフィ  
コ横浜, 神奈川, 三谷絹子.  
口演

12. The American Society of Hematology  
57th Annual Meeting  
Doi Y, Yokota T, Ishibashi T, Satoh Y,  
Ichii M, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H,  
Oritani K, Kanakura Y.  
SATB1 expression marks  
lymphoid-lineage-biased hematopoietic  
stem cells in mouse bone marrow.  
2015.12.5-8 (発表日 12.6), The Orange  
County Convention Center, Orlando, FL, USA,  
Williams DA.  
Poster

13. The American Society of Hematology  
57th Annual Meeting  
Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M,  
Sudo T, Satoh Y, Doi Y, Tanimura A,  
Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, Oritani  
K, Kanakura Y.  
ESAM is a novel human hematopoietic stem  
cell marker associated with a subset of  
human leukemias.  
2015.12.5-8 (発表日 12.5), The Orange  
County Convention Center, Orlando, FL, USA,  
Williams DA.  
Poster

14. The 44th Annual Scientific Meeting of  
International Society of Experimental  
Hematology  
Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M,  
Sudo T, Satoh Y, Doi Y, Tanimura A,  
Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, Oritani  
K, Kanakura Y.  
Endothelial cell-selective adhesion  
molecule is a novel human hematopoietic  
stem cell marker associated with a subset  
of human leukemias.  
2015.9.17-19 (発表日 9.18), Kyoto  
International Conference Center, Kyoto  
Japan, Frenette P.

〔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.hematology.pro>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 貴史 (YOKOTA Takafumi)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号: 60403200

(2) 研究分担者

織谷 健司 (ORITANI Kenji)  
国際医療福祉大学・医学部・教授  
研究者番号: 70324762

金倉 讓 (KANAKURA Yuzuru)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 20177489