

令和 4 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08863

研究課題名(和文)造血幹細胞抗原ESAMの欠損が胎生期に致死的な赤血球造血不全をきたすメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism by which deficiency of hematopoietic stem cell antigen ESAM leads to lethal erythropoietic failure during fetal life

研究代表者

上田 智朗 (Ueda, Tomoaki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60747517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：造血発生におけるEndothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM)の機能的意義を解明するため、ESAM欠損マウス、条件付きESAM欠損マウスの胎仔を解析した。ESAM欠損マウスの約半数は、胎生後期に死亡した。ESAM欠損胎仔肝では、成体型グロビンとAlas2の発現低下が見られることがRNA-seqで示され、これらの異常がESAM欠損造血幹細胞の機能異常に起因することを培養および移植実験により明らかにした。条件付きESAM欠損胎仔の解析により、血管内皮細胞のESAMも胎仔死亡に重要な役割を果たすことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ESAM 欠損マウス、独自に作製した条件付き ESAM 欠損マウスを解析することにより、ESAM が胎生期の造血機構の発生、特に成体型ヘモグロビン合成に重要で、ESAM 欠損により高率に胎生後期死亡をきたすことを明らかにした。また、造血幹細胞のみならず血管内皮細胞の ESAM も造血発生に寄与することがわかった。本研究成果により、造血発生の仕組み、特に赤血球造血に関する理解が深まると考えられる。再生医療や遺伝子治療を通じて、遺伝性貧血など先天性の造血器疾患の治療法開発への基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the functional significance of Endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM) in the development of hematopoiesis, we analyzed fetuses from conventional or conditional ESAM-knockout mice. Approximately half of ESAM-null fetuses died after mid-gestation. RNA-seq revealed downregulation of adult-type globins and Alas2 in ESAM-null fetal livers. These abnormalities were attributed to malfunction of ESAM-null hematopoietic stem cells, which was demonstrated in culture and transplantation experiments. Analysis of conditional ESAM-knockout fetuses revealed the critical involvement of ESAM expressed in endothelial cells in fetal lethality.

研究分野：造血幹細胞

キーワード：造血幹細胞 血管内皮細胞 ESAM 造血発生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、マウス造血幹細胞の新規表面抗原として、血管内皮関連分子である endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM) を同定した(Yokota T et al. Blood 2009)。ESAM は胎生 10.5 日の最初期の造血幹細胞においてすでに高発現しており、生誕後は胎生期と比較してやや発現量が減弱するものの、終生にわたり造血幹細胞マーカーとして有用であることが分かった。継続した研究で、成獣野生型マウスに 5-FU を接種し骨髄抑制を起こすと、造血幹細胞の ESAM 発現量が胎児レベルまで再活性化すること、ESAM 欠損マウスに抗腫瘍剤である 5-FU を投与すると、骨髄抑制が遷延し高率に死亡することが分かった(Sudo T et al. J Immunol 2012, PLoS One 2016)。これらのことから、造血幹細胞において、ESAM は単なる表面マーカーではなく、その機能において極めて重要な分子であると言える。

我々は、ESAM が高発現しており、かつ造血幹細胞の増殖・分化が盛んである胎生期造血の解析が、ESAM の機能解析において重要な情報を提示すると推測した。そこで ESAM 欠損マウスの胎仔の解析を行ったところ、胎生 15.5 日以降にホモ欠損胎仔は貧血様の外観を呈し高率に死亡することを見出した。さらに胎生 16.5 日の胎仔肝における発現遺伝子を詳細に解析したところ、成体型ヘモグロビン合成に関連する遺伝子の発現が、ESAM 欠損マウスで顕著に減少していることを見出した。以上から ESAM が胎生期赤血球造血に重要な機能的意義を有していると考え、本研究を行うに至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、胎生期において ESAM 欠損が致死的な赤血球造血障害を引き起こす分子メカニズムを明らかにすることである。今まで造血幹細胞マーカーは数多く報告されているが、その中で造血幹細胞の本質的な機能への関与が示されているものは極めて少ない。また、マウスとヒトで共通する造血幹細胞マーカーも少数である。本研究で着目している ESAM は、申請者らが同定したマウス・ヒト共通の新規造血幹細胞マーカーであり、造血幹細胞の機能にも関与している点で、極めてユニークな分子である。

### 3. 研究の方法

#### (1) ESAM 欠損マウスの解析

ESAM 欠損胎仔を用い、ESAM 欠損による造血幹細胞の数的、質的变化を検討した。次に、RNA-seq により ESAM 欠損による造血幹細胞での発現遺伝子変化を網羅的に解析した。さらに、クロスリンク法により造血幹細胞内に ESAM を介した細胞内シグナルを入れ、変動する遺伝子を RNA-seq により網羅的に解析した。

#### (2) 条件付き ESAM 欠損マウスの作製、解析

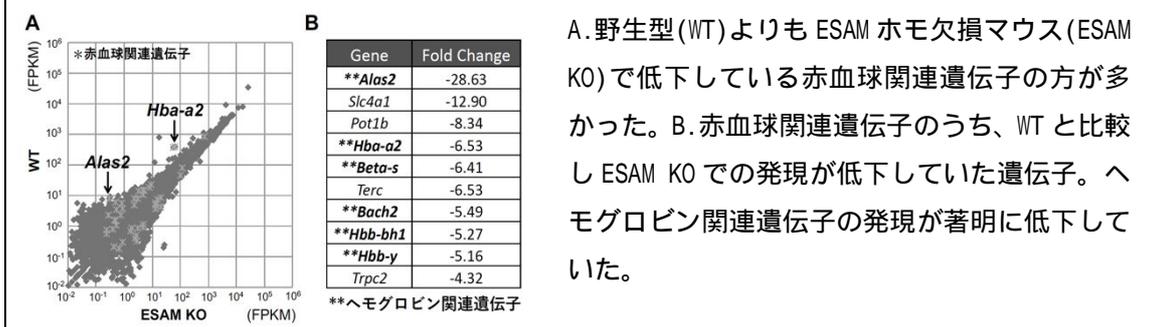
ESAM は血管内皮細胞と造血幹細胞に発現しているため、ESAM 欠損マウスで得られた結果が、どの系統の細胞の機能異常によるものかを明確にする必要がある。大阪大学大学院医学系研究科実験動物学教室との共同研究により、条件付き ESAM 欠損マウスを作製した。続いて Vav-Cre トランスジェニックマウスとの交配により造血幹細胞特異的に ESAM を欠損させた、条件付き欠損マウスを作製し解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 造血発生における造血幹細胞の ESAM の機能的意義

前述の通り、ESAM ホモ欠損胎仔は胎生 15.5 日以降に高率に死亡した。胎生 14.5 日の ESAM 欠損胎仔肝では、血球系細胞数、とりわけ造血幹細胞数が著明に減少しており、メチルセルロースアッセイを行うと ESAM 欠損胎仔肝由来の造血幹細胞は十分なコロニー形成能を有するものの、赤血球系コロニーである BFU-E 内での成体型グロビン遺伝子 (*Hba*, *Hbb-b1*)、ヘム合成に重要な *Alas2* 遺伝子の発現が有意に低下していた。また、移植実験においても、ESAM 欠損胎仔肝造血幹細胞は野生型と同等の生着能、造血幹細胞・骨髓系/リンパ系前駆細胞・赤血球再構築能を有するものの、ヘモグロビン合成能が低下していた。野生型、ESAM 欠損胎仔肝それぞれから分取した胎生 14.5 日造血幹・前駆細胞における遺伝子発現を RNA-seq により網羅的に比較したところ、ESAM 欠損胎仔肝造血幹・前駆細胞では複数の成体型グロビン遺伝子、*Alas2* の発現が著明に低下していた(図 1)。また、クロスリンク法を行うと、ヘモグロビン関連の遺伝子群が最も変動し、複数のグロビン遺伝子の発現が上昇していた。以上から造血幹細胞の ESAM が成体型ヘモグロビン合成に寄与していることが示唆された。

(図 1) ESAM 欠損マウスと野生型マウスの胎生 14.5 日の造血幹・前駆細胞での遺伝子発現比較

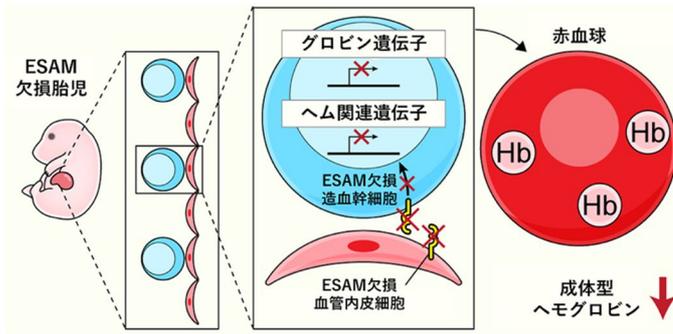


A. 野生型(WT)よりも ESAM ホモ欠損マウス(ESAM KO)で低下している赤血球関連遺伝子の方が多かった。B. 赤血球関連遺伝子のうち、WT と比較し ESAM KO での発現が低下していた遺伝子。ヘモグロビン関連遺伝子の発現が著明に低下していた。

##### (2) 造血発生における血管内皮細胞の ESAM の機能的意義

造血発生における血管内皮細胞の ESAM の影響を明らかにするため、条件付き ESAM 欠損マウスを作製した。造血幹細胞特異的欠損モデルとして用いられる Vav-Cre トランスジェニックマウスと独自に作製した ESAM-*fllox* マウスの交配により得られた Vav-Cre・ESAM<sup>fllox/fllox</sup> 胎仔は、ESAM ホモ欠損胎仔と比較して有意に死亡率が低かった。詳細に解析すると、Vav-Cre・ESAM<sup>fllox/fllox</sup> 胎仔肝臓では、造血幹細胞のみならず血管内皮細胞の ESAM も部分的に欠損しており、血管内皮細胞の ESAM の残存割合と造血幹細胞数に比例関係があることがわかった。また胎仔肝における造血幹細胞数は ESAM ホモ欠損マウスと比較し Vav-Cre・ESAM<sup>fllox/fllox</sup> マウスで有意に多かった。血管内皮細胞特異的に ESAM を欠損させたマウスの胎仔肝臓から採取した胎仔肝実質/間質細胞を支持細胞として、野生型マウスの胎仔肝臓から採取した造血幹細胞との器官培養を行なったところ、野生型の血管内皮細胞を支持細胞として用いた場合と比較して、産生される造血幹・前駆細胞数と CD45 陽性血液細胞数が有意に減少した。以上から血管内皮細胞の ESAM も造血発生に重要であり、造血幹細胞の維持と分化の誘導に寄与していることが示唆された。

これらの結果から ESAM は胎生期造血において機能を有する稀有な造血幹細胞表面抗原であり、造血幹細胞・血管内皮細胞それぞれの ESAM が造血発生に寄与していることが示された(図 2)。



**(図2) ESAM の胎生期造血における機能**

造血幹細胞上の ESAM が成体型ヘモグロビン合成に重要であり、血管内皮細胞の ESAM も成体型造血の発生に寄与している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueda Tomoaki, Yokota Takafumi, Okuzaki Daisuke, Uno Yoshihiro, Mashimo Tomoji, Kubota Yoshiaki, Sudo Takao, Ishibashi Tomohiko, Shingai Yasuhiro, Doi Yukiko, Ozawa Takayuki, Nakai Ritsuko, Tanimura Akira, Ichii Michiko, Ezoe Sachiko, Shibayama Hirohiko, Oritani Kenji, Kanakura Yuzuru	4. 巻 13
2. 論文標題 Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Contributes to the Development of Definitive Hematopoiesis in the Fetal Liver	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 992 ~ 1005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shingai Yasuhiro, Yokota Takafumi, Okuzaki Daisuke, Sudo Takao, Ishibashi Tomohiko, Doi Yukiko, Ueda Tomoaki, Ozawa Takayuki, Nakai Ritsuko, Tanimura Akira, Ichii Michiko, Shibayama Hirohiko, Kanakura Yuzuru, Hosen Naoki	4. 巻 39
2. 論文標題 Autonomous TGF signaling induces phenotypic variation in human acute myeloid leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 723 ~ 736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ozawa Takayuki, Fujii Kentaro, Sudo Takao, Doi Yukiko, Nakai Ritsuko, Shingai Yasuhiro, Ueda Tomoaki, Baba Yoshihiro, Hosen Naoki, Yokota Takafumi	4. 巻 208
2. 論文標題 Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 1 Supports Survival and Maturation of Naive B Cells Stimulated by B Cell Receptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1937 ~ 1946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2101097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoaki Ueda
2. 発表標題 Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Contributes to the Development of Definitive Hematopoiesis in the Fetal Liver
3. 学会等名 The 27th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	柴山 浩彦  (Shibayama Hirohiko)  (60346202)	大阪大学・医学系研究科・招へい教授   (14401)	
研究 分担者	横田 貴史  (Yokota Takafumi)  (60403200)	大阪大学・医学系研究科・准教授   (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------