

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591035

研究課題名（和文） 造血幹細胞特異的遺伝子の網羅的解析：自己複製・分化関連分子の同定

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of hematopoietic stem cell-specific genes

研究代表者

前田 哲生 (MAEDA TETSUO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00403064

研究成果の概要（和文）：

我々が新規造血幹細胞特異的の表面マーカーとして同定した endothelial cell-specific adhesion molecule-1 (ESAM-1) について、「造血幹細胞上の ESAM-1 の生理的意義」を明らかにすることを目的として研究を行った。マウスを 5-FU 処理した後の回復期にある造血幹細胞が ESAM-1 を高発現することを見出し、細胞周期と ESAM-1 発現との関連性を明らかにした。一方、ESAM-1 欠損マウスに対して 5-FU 処理を行った場合、赤血球の回復が遅延することが原因で、一部のマウスが死亡した。造血回復期の BFU-E, CFU-E コロニー形成細胞が著明に低値であり、造血幹細胞から赤芽球への早期分化段階に ESAM-1 が必要であると考えられた。また、ヒトにおける ESAM-1 の発現を検討した結果、造血幹細胞の他にも ESAM-1 高発現細胞集団が臍帯血中に存在した。これら細胞は造血細胞への分化を示さなかったものの、血管内皮細胞への分化能を有することが明らかになった。細胞治療の新しい材料として期待できる結果であると思われる。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to clarify meanings of endothelial cell-specific adhesion molecule-1 (ESAM-1) in hematopoietic stem cell biology. Expression of ESAM-1 was up-regulated when hematopoietic stem cells went into proliferation state. In ESAM-1-deficient mice, they died after 5-FU treatment by severe anemia. We found that ESAM-1 was required for early differentiation of red blood cells.

Although human hematopoietic stem cells expressed ESAM-1, we found a highly ESAM-1-expressing population in cord blood cells. They had an ability to differentiate into endothelial cells, thereby indicating as a new source of cell-based therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、赤血球、膜蛋白、ESAM-1、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は自己複製能を持ちながら、各

種成熟血球へと分化する多分化能を有している。この造血幹細胞を中心とした階層的な造血システムは、一生涯にわたりリンパ血液細胞を供給するだけでなく必要に応じて環境変化に対応することも可能である。再生不良性貧血や骨髄異形性症候群などは造血幹細胞レベルでの異常が指摘され、一部の骨髄性白血病では造血幹細胞レベルが腫瘍化の標的細胞であると考えられている。このように造血幹細胞の質的・量的な異常が種々のリンパ造血器疾患を引き起こす。一方、骨髄移植や臍帯血移植をはじめ近年盛んに研究が行われる再生医療の分野において造血幹細胞は非常に貴重な生体材料である。この造血幹細胞の自己複製や多分化能を人為的に制御できれば、種々のリンパ造血器疾患に対する新しい治療戦略が展開されるだけでなく、体外増幅された造血幹細胞を用いることによる移植の適応拡大・ドナー負担軽減なども可能となる。残念ながら、種々の増殖因子を組み合わせた培養やストローマ細胞との共培養など多くの試みにも関わらず、効率的な造血幹細胞の体外増幅法は確立されていない。実際、最適と考えられるサイトカインカクテルに YPWM モチーフを含む HOX decoy peptide を追加して CD34 陽性ヒト造血幹細胞培養を行った我々の実験でも、造血幹細胞を数倍に増幅できたが臨床応用できる程度ではなかった。さらなる造血幹細胞の未分化性維持や自己複製に関わる分子群の同定とその相互関係に関する新しい知見が必要と思われる。

我々は、造血幹細胞特異的表面マーカーとして新たに endothelial cell-specific adhesion molecule-1 (ESAM-1) を同定した。ESAM-1 発現強度により LSK (Lin⁻ Sca1⁺ c-kit⁺) 細胞分画を 2 分することができる。ESAM-1^{high} 分画には、血液細胞と同時にリンパ球を産生する細胞（いわゆる造血幹細胞）が非常に高率に含まれていた。さらに、ESAM-1^{high} 分画のみが骨髄再構築能を有していた。即ち、申請者らは、ESAM-1 発現を指標に、造血幹細胞を高率に含む細胞群を取り出すことに成功した。ESAM-1 は、細胞外領域に 2 つの免疫グロブリンドメインを持つ膜蛋白であり、血管内皮細胞の tight junction に存在することが知られている。ESAM-1 は homotypic な細胞接着に関与すると考えられており、事実、ESAM-1 の作用として好中球 extravasation への関与が知られている。

2. 研究の目的

新しい造血幹細胞マーカーとして ESAM-1 を同定した申請者らは、「造血幹細胞に発現されている ESAM-1 はどのような役割があるのだろうか?」「ESAM-1 を新しい指標として加えることで造血幹細胞をより高率に含む

分画を単離できることから、今まで困難であった造血幹細胞特性に関する解析が可能になるのでは?」などの新たな興味を抱いた。本研究では、「ESAM-1 欠損造血幹細胞の機能解析」や「造血幹細胞における ESAM-1 遺伝子発現様式」を解析すると共に「LSK 細胞中に存在する ESAM-1^{high} 細胞と ESAM-1^{Lo} 細胞との間の遺伝子発現の違いを解析し、造血幹細胞の未分化維持や初期分化に関わる新たな候補分子を選別する」ことを計画している。

3. 研究の方法

(1) 造血幹細胞における ESAM-1 遺伝子発現様式の解析

マウスを 5-FU 処理した際、骨髄細胞枯渇に反応して細胞周期に入った造血幹細胞分画の ESAM-1 発現について検討する。

(2) ESAM-1 欠損造血幹細胞の機能解析

ESAM-1 欠損マウスは、生存可能であり、野生型マウスと遜色なく成長する。そこで、造血幹細胞特性に焦点を絞り、骨髄中に存在する造血幹細胞数を解析するとともに、5-FU 処理による骨髄細胞枯渇に対する造血幹細胞の反応を解析する。

(3) ヒト造血幹細胞における ESAM-1 発現の解析

臍帯血細胞をマルチカラーフローサイトにて解析する。

4. 研究成果

Endothelial cell-specific adhesion molecule-1 (ESAM-1) は、新しい造血幹細胞特異的表面マーカーとして我々が同定した分子である。造血幹細胞における ESAM-1 の発現意義について、動物実験モデルを用いて解析した。

5-FU 処理後の血球回復期にある骨髄細胞の ESAM-1 発現を Flow cytometer にて解析した。回復期にある造血幹細胞は非常に高い ESAM-1 発現が認められた。ESAM-1 を高発現する細胞はすべて細胞周期に入っていることも確認した。また、ESAM-1 欠損マウスに対して 5-FU 処理を行った場合、赤血球の回復が遅延することが原因で、一部のマウスが死亡することが明らかになった。5-FU 処理の骨髄では、造血回復期の BFU-E, CFU-E コロニー形成細胞が著明に低値であり、造血幹細胞から赤芽球への早期分化段階で障害が認められた。ESAM-1 は造血幹細胞や血管内皮細胞で発現が認められる膜蛋白である。Erythropoietin などはむしろ ESAM-1 欠損マウスで増加していたことから、赤血球回復遅延の原因として血液細胞 (ESAM-1 欠損) に問題があると考えられた。更なる解析を進めるため、野生型および ESAM-1 欠損マウスの造血幹細胞の遺伝子発現を網羅的に比較するための DNA array を予定しており、既に、両

細胞分画から RNA を回収した。

ヒトにおける ESAM-1 の発現を検討した結果、臍帯血中に ESAM-1 を高発現する細胞集団が存在した。これら細胞は造血細胞への分化を示さなかったものの、血管内皮細胞への分化能を有することが明らかになった。細胞治療の新しい材料として期待できる結果であると思われる。

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 4 件)

- ① Sudo T, Yokota T, Oritani K, Satoh Y, Sugiyama T, Ishida T, Shibayama H, Ezoe S, Fujita N, Tanaka H, Maeda T, Nagasawa T, Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM monitors hematopoietic stem cell status between quiescence and self-renewal. J Immunol 189:200-210, 2012 (査読：有)
- ② Chihara T, Wada N, Kohara M, Matsui T, Masaya H, Maeda T, Shibayama H, Kanakura Y, Tani M, Morii E, Aozasa K. Peripheral T-cell lymphoma of Lennert type complicated by monoclonal proliferation of large B-cells. Pathol Res Pract 206:185-190, 2010 (査読：有)
- ③ Nakaoka H, Sakata Y, Yamamoto M, Maeda T, Arita Y, Shioyama W, Nakaoka Y, Kanakura Y, Yamashita S, Komuro I, Yamauchi-Takahara K. Pulmonary hypertension associated with bone marrow transplantaion. J Cardiol cases 2:23-27, 2010 (査読：有)
- ④ Arita Y, Sakata Y, Sudo T, Maeda T, Matsuoka K, Tamai K, Higuchi K, Shioyama W, Nakaoka Y, Kanakura Y, Yamauchi-Takahara K. The efficacy of tocilizumab in a patient with pulmonary arterial hypertension associated with Castleman's disease. Heart Vessels 25:444-447, 2010 (査読：有)

[学会発表] (計 17 件)

- ① 佐多 弘 ら：5.0mg/kg のサイモグロブリン®(rATG, Genzyme) を前処置に用いた同種造血幹細胞移植における感染症についての検討、第 34 回日本造血細胞移植学会総会 (2012. 2. 24-25, 大阪)
- ② 柴田 大 ら：坐骨神経痛にて発症した Neurolymphomatosis と思われる DLBCL の一例、第 97 回近畿血液学地方会 (2012. 6. 23, 大阪)
- ③ 一井倫子 ら：多発性骨髄腫の予後予測

解析ツールとしてのマルチカラー・フローサイトメトリーの可能性、第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会 (2012. 6. 29-30, 大阪)

- ④ 一井倫子 ら：多発性骨髄腫患者における骨髄内 B リンパ球前駆細胞評価の臨床的意義、第 37 回日本骨髄腫学会学術集会 (2012. 7. 7-8, 京都)
- ⑤ 木田 亨 ら：ボルテゾミブを長期投与された再発・難治性多発性骨髄腫における開始時用法・用量調整と転帰の後方視的検討、第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都)
- ⑥ 谷 瑞季 ら：重篤な天疱瘡で発症した濾胞性リンパ腫の一例、第 98 回近畿血液学地方会 (2012. 12. 1, 京都)
- ⑦ 前田哲生 ら：血液悪性腫瘍に対する同種造血幹細胞移植の前処置における減量 rATG (rabbit antithymocyte globulin) の影響、第 33 回日本造血細胞移植学会総会 (2011. 3. 9-10, 愛媛)
- ⑧ 福島健太郎 ら：骨髄性悪性疾患に対する FLU/BU/MEL を前処置とした造血幹細胞移植、第 33 回日本造血細胞移植学会総会 (2011. 3. 9-10, 愛媛)
- ⑨ 佐多 弘 ら：再生不良性貧血に対し rATG (サイモグロブリン) を用いた前処置にて施行した同種骨髄移植の検討、第 33 回日本造血細胞移植学会総会 (2011. 3. 9-10, 愛媛)
- ⑩ 西脇 悠 ら：Autoimmune Cytopenia 合併が考えられた慢性リンパ性白血病の 1 例、第 95 回近畿血液学地方会 (2011. 6. 18, 兵庫)
- ⑪ 大塚正恭 ら：当科における悪性リンパ腫に対する DeVIC 療法施行例の後方視的検討、第 9 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (2011. 7. 21-23, 神奈川)
- ⑫ 福島健太郎 ら：同種造血細胞移植における ATG(サイモグロブリン) 投与後の EB ウイルス再活性化・LPD の発症の検討、第 73 回日本血液学会学術集会 (2011. 10. 14-16, 愛知)
- ⑬ 下村良充 ら：肺炎球菌性肺炎に心外膜炎を合併した移植後 AML の一例、第 96 回近畿血液学会地方会 (2011. 11. 12, 大阪)
- ⑭ 木田 亨 ら：初診時再生不良性貧血が疑われ、分染法にて正常核型を示した急性前骨髄球性白血病の 1 例、第 93 回近畿血液学地方会 (2010. 6. 19, 大阪)
- ⑮ Fukushima K, et al: Combination therapy with Nilotinib and Gefitinib for adenocarcinoma of lung following chronic myelogenous leukemia. 第 69 回日本癌学会学術総会 (2010. 9. 22-24, 大阪)

- ⑩ Hasei H, et al : Safety and efficiency of VAD-BD switched protocol for patients with multiple myeloma. 第72回日本血液学会学術集会 (2010.9.24-26, 神奈川)
- ⑪ 野山知美 ら : APTT モニタリングに基づいた第 VIII 因子製剤の補充で安全に肝、腎腫瘍摘出を行えたインヒビター保有血友病 A の 1 症例、第 94 回近畿血液学地方会 (2010.11.6, 滋賀)

[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

前田 哲生 (MAEDA TETSUO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 00403064

(2) 研究分担者

金倉 譲 (KANAKURA YUZURU)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 20177489

織谷 健司 (ORITANI KENJI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 70324762

横田 貴史 (YOKOTA TAKAFUMI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 60403200

(3) 連携研究者

なし