

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24591423
 研究課題名(和文)新規表面抗原ESAMを指標とした造血幹細胞の生理的特性の解析と白血病診断への応用

 研究課題名(英文)Biological characterization of hematopoietic stem cells and leukemic cells by monitoring ESAM expression

 研究代表者
 横田 貴史(YOKOTA, Takafumi)

 大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

 研究者番号：60403200

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：成体の骨髄において造血幹細胞の多くが静止状態にあるが、骨髄抑制が生じると反応性に素早く増殖する。本研究において我々はEndothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM)が静止期において発現が低く、活性化状態において発現上昇することを見出し、造血幹細胞の活性化をモニターできる有用なマーカーであることを明らかにした。また、ESAMはヒトにおいても臍帯血・骨髄・動員末梢血中のCD34陽性CD38陰性分画において高発現しており、さらにヒト急性白血病の系統診断においても有用であるのみならず、腫瘍細胞の性質を評価する上でも有用であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells (HSCs) have potencies for differentiation and self-renewal to supply blood cells throughout life. In homeostasis, most HSCs exist in a quiescent state. However, they immediately proliferate in response to myelosuppression. In this study, we have shown that monitoring of endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM) level is useful to indicate HSC activation in mice. ESAM levels clearly mirrored the shift of HSCs between quiescence and activation, and it was prominent in comparison to other HSC markers. Although human HSCs are of great value in treatment for hematopoietic diseases and in regenerative medicine, studies for their nature are hampered by a paucity of information about their precise immunophenotype. This is in stark contrast to the mouse, which is much more characterized in this regard. In this study we report that ESAM is a robust marker of human HSCs, and is also found specifically on an aggressive subset of leukaemia cell lines.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞 白血病

1. 研究開始当初の背景

(1) 成体の骨髄における造血幹細胞は、静止状態と自己複製的増殖および成熟血球への分化のバランスを保ちながら、生涯にわたって血液細胞を供給している。この制御には、造血幹細胞を取り巻く環境が重要な働きをしている。この造血幹細胞の制御に関わる環境は“造血幹細胞ニッチ”という概念でとらえられているが、骨髄には間葉系幹細胞・骨芽細胞・脂肪細胞・血管内皮細胞など多様な非血液細胞が存在しており、造血幹細胞の分化・増殖を制御する機構の本質は不明であった。

(2) 白血病を始めとする多系統の造血器腫瘍において癌幹細胞の存在が提唱されていた。また、白血病幹細胞が正常造血幹細胞から競合的にニッチを奪い取ることを示す論文も出版されていた。これらのことから、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、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と考えられた。

2. 研究の目的

幹細胞の状態は、生体全体からの要求に応じて変動する。造血幹細胞も例外ではなく、その活性化と休眠は、細胞を取り巻く環境からのシグナルによって精巧に調節されている。この調節機構には、サイトカインなどの分泌蛋白のみならず、細胞間の直接接合も重要であると考えられるが、その詳細な分子機構は不明である。最近の研究で申請者は、造血幹細胞の新規マーカー endothelial selective-adhesion molecule (ESAM) を発見した。継続した検討で ESAM の発現レベルが、造血幹細胞の状態を反映して顕著に変動する事が分かった。本研究では、造血幹細胞の活性化に伴う ESAM の発現上昇の生理的意義を明らかにし、さらに白血病幹細胞のマーカーとしての有用性と治療標的としての可能性を解析する。

3. 研究の方法

造血幹細胞の活性化に伴う ESAM の発現上昇の生理的意義を解明し、さらに白血病の診断マーカーとしての有用性と治療標的としての可能性を明らかにするため、

- (1) ESAM を高発現する活性化造血幹細胞の局在と生理的特質を、免疫組織染色と移植実験で解析する。さらに ESAM の発現を制御する細胞内の分子メカニズムを明らかにする。
- (2) 造血幹細胞上の ESAM の機能を、ESAM ノックアウトマウスを用いて解析する。また ESAM を介してどのようなシグナルが造血幹細胞内に伝わるのかを解析する。
- (3) ヒト白血病細胞上の ESAM の発現を、白

血病の病型ごとに解析する。また白血病幹細胞と考えられる集団が ESAM を発現しているのかどうか、治療標的となり得るのかどうかを、免疫不全マウスへの移植の実験系を用いて解析する。

4. 研究成果

(1) 本研究において我々は Endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM) が、成体の造血幹細胞において定常状態から活性状態への移行に伴って顕著に発現上昇することを見出した(図1)。ESAM 高発現造血幹細胞は、細胞周期が活性化していると同時に高い長期造血再構築能力を示した。ESAM 高発現造血幹細胞の多くは血管内皮近傍に存在しており、活性化造血幹細胞と血管内皮細胞との緊密な関係が示唆された。ESAM 欠損マウスでは野生型マウスに比して骨髄抑制後の造血回復が顕著に遅延したことから、ESAM は活性化造血幹細胞において機能的にも重要な分子であると考えられた。また ESAM の発現上昇に関わる造血幹細胞内部の分子機構として、NF- κ B とトポイソメラーゼ II を同定した。

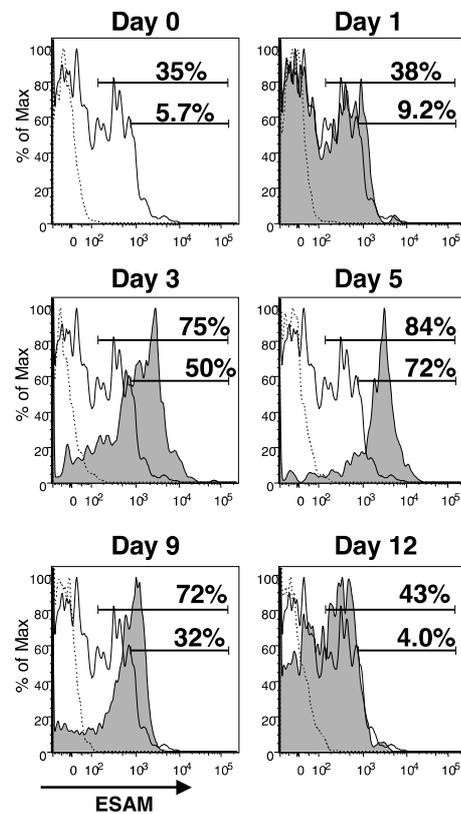


図1 5-FU 投与後の骨髄造血幹細胞における ESAM の発現変化

灰色のヒストグラムが解析日の造血幹細胞上の ESAM 発現強度、点線は isotype control 抗体での染色データ、実線は 5-FU 投与後の造血幹細胞上の ESAM 発現強度を示す。

(2) ヒト臍帯血において、造血幹細胞が濃縮されている CD34 陽性 CD38 陰性分画のほとんどの細胞が、ESAM を高発現していた(図 2A)。各種培養系や免疫不全マウスへの移植実験にて機能解析を行った結果、長期造血再構築能力を持つ多能性造血幹細胞は CD34 陽性 CD38 陰性 ESAM 陽性分画に存在することが明らかとなった。さらに成人骨髄や G-CSF によって末梢血中に動員された CD34 陽性 CD38 陰性も、その多くが ESAM を発現しており、多能性前駆細胞は ESAM 高発現分画に濃縮されていることが分かった(図 2B)。これらの知見から、ESAM はヒトにおいても造血幹細胞のマーカーとして有用であり、そのソースとなる組織に関わらず、造血幹細胞を濃縮できる普遍的な指標となり得ると考えられた。

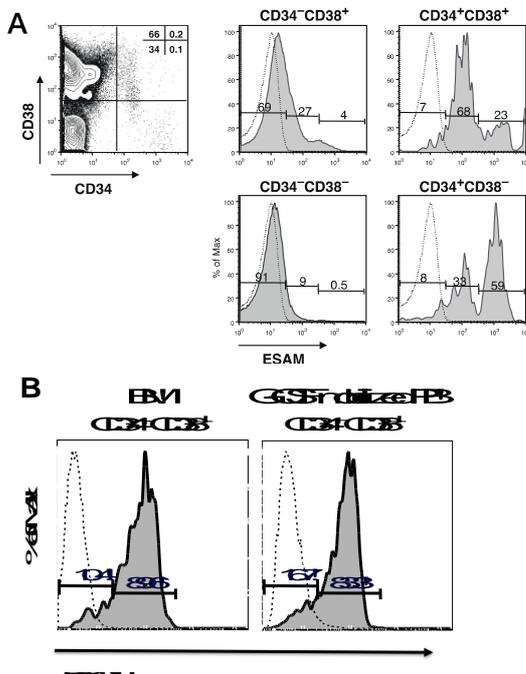


図 2 ヒト造血幹細胞の ESAM の発現様式
A. 臍帯血の単核球における CD34, CD38 の発現(左上)と、各分画における ESAM の発現強度。灰色のヒストグラムが各分画での ESAM の発現強度で、実線は isotype control 抗体での染色データ。
B. 成人骨髄および末梢血動員の CD34 陽性 CD38 陰性分画における ESAM の発現強度。灰色のヒストグラムが各分画での ESAM の発現強度で、点線は isotype control 抗体での染色データ。

(3) ヒト白血病細胞における ESAM の発現に関して解析を進めた。ヒト白血病細胞株を用いた検討では、赤芽球・巨核球系の腫瘍細胞が ESAM 陽性、リンパ球性白血病細胞株は ESAM 陰性、骨髄性白血病細胞株には ESAM 陽性・陰性両方が認められた。ヒト急性骨髄性白血病の初発症例においては ESAM の発現は一様でなく、同一の病型(例えば急性前骨髄性白血病)でも陽性の症例と陰性の症例が存在した(図 3)。興味深いことに、ESAM 陰性の急性

骨髄白血病細胞株 KG1a を免疫不全マウスに移植し、白血病を発症させることを繰り返すと、KG1a の腫瘍活性の増加とともに ESAM の陽性化が観察できた。これらの結果は、ESAM が急性白血病の系統診断において有用であるのみならず、骨髄性白血病において腫瘍細胞の性質を評価する上でも有用である可能性を示唆していた。

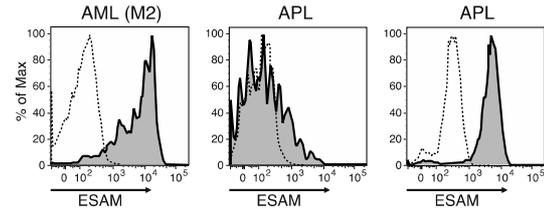


図 3 ヒト急性骨髄性白血病症例における ESAM の発現様式

各症例において白血病細胞集団にゲートをかけて ESAM の発現様式を検討した。灰色のヒストグラムが白血病細胞分画での ESAM の発現強度で、点線は isotype control 抗体での染色データ。

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 12 件)

Yokota T, Oritani K, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Habuchi Y, Ichii M, Fukushima K, Okuzaki D, Tomizuka K, Yamawaki K, Kakitani M, Shimono A, Morii E, Kincade PW, Kanakura Y. Estrogen-inducible sFRP5 inhibits early B-lymphopoiesis in vivo, but not during pregnancy. *Eur J Immunol.* 45:1390-1401(2015) DOI: 10.1002/eji.201444939. 査読有

横田 豊史, 金倉 譲 リンパ球への分化と転写制御 *臨床免疫・アレルギー科* 62(2):227-232 (2014) 査読無

Tanimura A, Shibayama H, Hamanaka Y, Fujita N, Ishibashi T, Sudo T, Yokota T, Ezo S, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kanakura Y. The anti-apoptotic gene Anamorsin is essential for both autonomous and extrinsic regulation of murine fetal liver hematopoiesis. *Exp Hematol.* 42:410-422 (2014) DOI: 10.1016/j.exphem.2014.01.002. 査読有

Fujita N, Oritani K, Ichii M, Yokota T, Saitoh N, Okuzaki D, Sekine Y, Kon S, Muromoto R, Saitoh K, Yoshimura A, Matsuda T, Kanakura Y.

Signal-transducing adaptor protein-2 regulates macrophage migration into inflammatory sites during dextran sodium sulfate induced colitis. *Eur J Immunol.* 44:1791-1801 (2014) DOI: 10.1002/eji.201344239. 査読有

Rai S, Tanaka H, Suzuki M, Ogoh H,

Taniguchi Y, Morita Y, Shimada T, Tanimura A, Matsui K, Yokota T, Oritani K, Tanabe K, Watanabe T, Kanakura Y, Matsumura I. Clathrin assembly protein CALM plays a critical role in KIT signaling by regulating its cellular transport from early to late endosomes in hematopoietic cells. *PLoS One* 9(10):e109441 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0109441. 査読有
Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, Kallies A, Nutt SL, Sakaguchi S, Takeda K, Kurosaki T, Baba Y. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 41:1040-1051, (2014) 査読有
Yokota T. Guest editorial: molecular mechanisms of lymphocyte development: recent findings. *Int J Hematol.* 100:218-219 (2014) DOI: 10.1007/s12185-014-1645-4. 査読無
Yokota T, Kanakura Y. Role of tissue-specific AT-rich DNA sequence-binding proteins in lymphocyte differentiation. *Int J Hematol.* 100:238-245 (2014) DOI: 10.1007/s12185-014-1602-2. 査読有
Yokota T, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Ichii M, Oritani K, Kanakura Y. Complementary regulation of early B-lymphoid differentiation by genetic and epigenetic mechanisms. *Int J Hematol.* 98:382-389 (2013) DOI: 10.1007/s12185-013-1424-7. 査読有
Sato Y, Yokota T, Sudo T, Kondo M, Lai A, Kincade PW, Kouro T, Iida R, Kokame K, Miyata T, Habuchi Y, Matsui K, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y. The Satb1 Protein Directs Hematopoietic Stem Cell Differentiation toward Lymphoid Lineages. *Immunity* 38:1105-1115 (2013) DOI: 10.1016/j.immuni.2013.05.014. 査読有
Zhang Q, Iida R, Yokota T, Kincade PW. Early events in lymphopoiesis: an update. *Current Opinion in Hematology* 20:265-272 (2013) DOI: 10.1097/MOH.0b013e3283612628. 査読無
Sudo T, Yokota T, Oritani K, Sato Y, Sugiyama T, Ishida T, Shibayama H, Ezo 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. *The Journal of Immunology* 189:200-210 (2012) DOI:10.4049/jimmunol.1200056. 査読有

〔学会発表〕(計 12件)

第74回日本血液学会総会

Sudo T, Yokota T, Oritani K, Sato Y, Sugiyama T, Ishida T, Shibayama H, Ezo S, Ichii M, Tanimura A, Fujita N, Ishibashi T, Matsui K, Hamanaka Y, Nagasawa T, Kanakura Y.

Role of endothelial antigen ESAM in hematopoietic stem cells status.

2012.10.19-21 (発表日 10.20), 京都国際会議場 (京都市)

第74回日本血液学会総会

Ishibashi T, Yokota T, Sato Y, Sudo T, Ichii M, Shibayama H, Ezo S, Tanimura A, Fujita N, Matsui K, Hamanaka Y, Oritani K, Kanakura Y.

Significance of novel HSC marker ESAM expression in cord blood

2012.10.19-21 (発表日 10.19), 京都国際会議場 (京都市)

第41回日本免疫学会総会

Sudo T, Yokota T, Oritani K, Sato Y, Sugiyama T, Nagasawa T, Kanakura Y.

The endothelial antigen ESAM level distinguishes HSC status between quiescence and self-renewal

2012.12.5-7(発表日 12.6), 神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場 (神戸市)

第75回日本血液学会学術集会

Yokota T, Oritani K, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Ichii M, Tomizuka K, Yamawaki K, Shimono A, Kanakura Y.

SFRP5 inhibits early B-lymphopoiesis and modulates estrogen-induced changes in the immune system.

2013.10.11-13 (発表日 10.11), ロイトン札幌 (札幌市)

第75回日本血液学会学術集会

Ishibashi T, Yokota T, Sato Y, Sudo T, Ichii M, Shibayama H, Ezo S, Tanimura A, Fujita N, Matsui K, Hamanaka Y, Doi Y, Oritani K, Kanakura Y.

Expression of MS4A3 marks early myeloid-lineage differentiation in human hematopoietic.

2013.10.11-13 (発表日 10.12), ロイトン札幌 (札幌市)

第75回日本血液学会学術集会

Sudo T, Yokota T, Oritani K, Ichii M, Ishibashi T, Fujita N, Kanakura Y.

YA new HSC marker ESAM is necessary for erythroid cell recovery after bone marrow injury

2013.10.11-13 (発表日 10.12), ロイトン札幌 (札幌市)

The American Society of Hematology 55th Annual Meeting

Yokota T, Oritani K, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Habuchi Y, Ichii M, Okuzaki D, Tomizuka K, Yamawaki K, Kakitani M, Shimono A, Morii E, Kincade PW, Kanakura

Y.

SFRP5 inhibits early stages of B-cell differentiation and modulates estrogen-related changes in the immune system.

2013.12.6-10 (発表日 12.8), Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, Louisiana, USA

The American Society of Hematology 55th Annual Meeting

Ishibashi T, Yokota T, Ichii M, Satoh Y, Sudo T, Fujita S, Doi Y, Fujita N, Nagate Y, Hamanaka Y, Matsui K, Tanimura A, Saitoh N, Ezoe S, Shibayama H, Kincade PW, Oritani K, Kanakura Y.

Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Marks Human Hematopoietic Stem Cells Regardless Of The HSC Sources

2013.12.6-10 (発表日 12.8), Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, Louisiana, USA

第 76 回日本血液学会学術集会

石橋知彦, 横田貴史, 一井倫子, 数藤孝雄, 佐藤友亮, 土居由貴子, 藤田奈津子, 長手泰宏, 濱中有理, 松井敬子, 谷村 朗, 齋藤則充, 江副幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓

Endothelial antigen ESAM marks human hematopoietic stem/progenitor cells in diverse sources.

2014.10.31-11.2 (発表日 10.31), 大阪国際会議場 (大阪市)

第 76 回日本血液学会学術集会

土居由貴子, 横田貴史, 谷村 朗, 齋藤則充, 一井倫子, 江副幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓

Functional analysis of a chromatin-remodeling protein in early lymphoid differentiation.

2014.10.31-11.2 (発表日 11.1) 大阪国際会議場 (大阪市)

第 76 回日本血液学会学術集会

数藤孝雄, 横田貴史, 杉山立樹, 奥崎大介, 一井倫子, 石橋知彦, 磯野友美, 羽瀧洋子, 織谷健司, 長澤丘司, 金倉 讓

ESAM on hematopoietic cells is essential for recovery of erythropoiesis after bone marrow injury.

2014.10.31-11.2 (発表日 11.1), 大阪国際会議場 (大阪市)

The American Society of Hematology 56th Annual Meeting

Ishibashi T, Yokota T, Satoh Y, Sudo T, Doi Y, Fujita N, Nagate Y, Hamanaka Y, Matsui K, Tanimura A, Ichii M, Saitoh N, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y.

MS4A3 Marks Early Myeloid

Differentiation in Human Hematopoiesis
2014.12.6-9 (発表日 12.8), Moscone Center, San Francisco, USA

〔図書〕(計 3件)

横田貴史「リンパ球の発生・分化と老化」AnnualReview 血液 2015 中外医学社 17 pages (p10-26) (2015) 査読無

Sudo T, Yokota T, Ishibashi T, Ichii M, Doi Y, Oritani K, Kanakura Y. Canonical HSC Markers and Recent Achievements.

“Stem Cell Biology in Normal Life and Diseases” Chapter 4, 14 pages (p51-64) Intech Open Access Publisher (2013) 査読有

Yokota T, Oritani K, Butz S, Ewers S, Vestweber D, Kanakura Y. Markers for Hematopoietic Stem Cells: Histories and Recent Achievements. “Advances in Hematopoietic Stem Cell Research” Chapter 4 12 pages (p77-88) Intech Open Access Publisher (2012) 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 貴史 (YOKOTA Takafumi)
大阪大学大学院医学系研究科・助教
研究者番号：6 0 4 0 3 2 0 0

(2) 研究分担者

織谷 健司 (ORITANI Kenji)
大阪大学大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：7 0 3 2 4 7 6 2

金倉 讓 (KANAKURA Yuzuru)
大阪大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号：2 0 1 7 7 4 8 9