

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461446

研究課題名(和文) ヒト造血幹細胞におけるESAMの発現とその意義

研究課題名(英文) ESAM is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias

研究代表者

石橋 知彦 (Ishibashi, Tomohiko)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：30722285

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)：造血幹細胞の表面抗原を明らかにすることは、造血幹細胞研究の進展や造血幹細胞移植・再生医療など臨床応用の発展のために重要である。本研究では、我々が以前マウス造血幹細胞マーカーとして有用性を報告した血管内皮抗原ESAMが、ヒトにおいても造血幹細胞マーカーとして有用であり、ESAM発現を指標としてヒト造血幹細胞を濃縮できることを明らかにした。臍帯血CD34+CD38-分画にはESAMを非常に強く発現する細胞が認められ、これらは血管内皮に関連する細胞であると考えられた。ESAMは急性骨髄性白血病症例の多くで発現しており、白血病細胞株を用いた解析からは骨髓環境への親和性に関連していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Reliable markers are essential to increase our understanding of the biological features of human hematopoietic stem cells (HSCs). We found that endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM) can be used to purify human HSCs from all the currently available sources (adult bone marrow [BM], mobilized peripheral blood, and cord blood [CB]). Multipotent colony-forming units and long-term hematopoietic-reconstituting cells in immunodeficient mice were found exclusively in the ESAM(High) fraction of CD34+CD38- cells. The CD34+CD38- fraction of CB contained cells exhibiting extremely high expression of ESAM; these cells are likely to be related to the endothelial lineage. High ESAM expression was observed in some primary acute myeloid leukemia cells. Furthermore, KG-1a myeloid leukemia cells switched from ESAM negative to ESAM positive with repeated leukemia reconstitution in vivo. Thus, ESAM is a useful marker for studying both human HSCs and leukemia cells.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を持ち、生涯にわたる造血を維持する。その異常は白血病などの造血器腫瘍を引き起こす。また、造血幹細胞移植は血液疾患の治療法として実臨床で広く行われており、造血幹細胞の機能解析は、正常造血を理解するためだけではなく、白血病の発症機構や治療耐性機構の解明、造血幹細胞移植の成績向上のためにも重要である。

造血幹細胞の機能解析を進めるためには、より高純度の造血幹細胞を分離することが不可欠であり、新たな造血幹細胞マーカーの同定が望まれる。マウスにおいては従来の Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺に加えて、CD150、CD48 といった SLAM ファミリーを用いることにより、高度に造血幹細胞を純化できるようになってきた。しかし、ヒトの造血幹細胞では CD150 や Sca-1 の発現がみられない。またマウス造血幹細胞は CD34⁺ 分画に存在するが、ヒト造血幹細胞は CD34⁺ 分画に存在するなど、様々な相違点が明らかとなっており、これらの種間の違いが、マウスの知見をヒトに応用する上で障害となっていた。

我々は、マウスにおける新規造血幹細胞マーカーとして、血管内皮関連抗原である endothelial selective adhesion molecule (ESAM) を同定した (Yokota T, et al. Blood 113:2914, 2009)。継続的な研究により、ESAM は定常状態の造血幹細胞のマーカーとして有用であるだけでなく、造血幹細胞の休眠、活性化状態をモニターするマーカーとしても有用であり、造血幹細胞の機能的にも重要であることも報告した (Sudo T, Yokota T, et al. J Immunol 189:200, 2012)。

しかし、ヒト造血幹細胞における ESAM の発現パターンやその意義については、まだ明らかにされておらず、ヒトとマウスでは造血幹細胞マーカーに関して相違点も多いことから、ヒト造血幹細胞における ESAM 発現の意義については改めて検討が必要であった。

2. 研究の目的

ヒト造血幹細胞における ESAM 発現と造血幹細胞の機能との関係を明らかにし、ESAM 発現を指標とした高度な造血幹細胞純化へ繋げることを第一の目的とした。また、造血幹細胞に遺伝子異常が加わることにより白血病などの造血器腫瘍を引き起こすが、白血病においては近年、白血病幹細胞の概念が提唱されている。白血病幹細胞は休眠状態にあって抗癌剤や放射線に抵抗性を示し、治療後の再発に関与していると考えられているが、ESAM はマウス造血幹細胞の休眠、活性化状態の指標としても有用であり、白血病細胞においても、ESAM 発現がよい指標となる可能性がある。これは、白血病の分子機構の解明や、新規治療法の開発などの臨床応用

への可能性に繋がると考えられ、ヒト白血病細胞における ESAM 発現とその意義を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

ヒト検体の解析については、大阪大学医学部附属病院倫理委員会の承認のもと、提供者から書面による同意を得て、余剰検体を解析対象とした。

① ヒト造血幹細胞における ESAM 発現パターンの解析

現在臨床で一般的に用いられている造血幹細胞ソースである、骨髄、G-CSF 投与後の末梢血、臍帯血から単核球を分離した。フローサイトメトリーを用いて、CD34⁺ CD38⁻ 分画の ESAM 発現を測定した。

② CD34⁺ CD38⁻ 分画細胞の ESAM 発現の機能的意義の解析

CD34⁺ CD38⁻ 分画を ESAM 発現強度を指標としてセルソーターを用いて分取し、メチルセルロース培地を用いたコロニーアッセイ、MS5 ストローマ細胞との共培養実験により、造血幹前駆細胞機能を評価した。

③ ESAM 発現を指標とした臍帯血造血幹細胞の純化効率の向上

臍帯血 CD34⁺ CD38⁻ 分画を ESAM 発現強度を指標としてセルソーターを用いて分取し、放射線照射した免疫不全マウス (NOG マウス) へ移植した。3 ヶ月後に骨髄を採取し、フローサイトメトリーを用いてヒト血球生着を解析した。さらに二次移植を行い 4 ヶ月後の骨髄をフローサイトメトリーで解析し、長期の造血再構築を評価した。

④ ヒト白血病細胞における ESAM 発現パターンの解析

ヒト白血病細胞株、および白血病症例から得られた骨髄サンプルを用いて、フローサイトメトリーにより ESAM 発現パターンを解析した。白血病の病型による ESAM 発現の違いについても検討した。

⑤ ヒト白血病細胞における ESAM 発現の機能的意義の解析

ヒト急性骨髄性白血病細胞株である KG-1a 細胞を免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) へ移植し、生着した KG-1a 細胞の ESAM 発現の変化をフローサイトメトリーで解析した。生着した KG-1a 細胞を ESAM 発現強度を指標としてセルソーターで分取して再度 NOD/SCID マウスへ移植し、ESAM 発現の機能的意義を検討した。

4. 研究成果

① ヒト造血幹細胞における ESAM 発現パターンの解析

骨髄、G-CSF 投与後末梢血、臍帯血のい

れにおいても、ヒト造血幹細胞が含まれる CD34⁺ CD38⁻ 分面の多くが ESAM を発現していた。臍帯血中では、骨髄や G-CSF 投与後の末梢血には認められなかった ESAM をより高発現する細胞 (ESAM^{Bright} 細胞) が認められた (図 1A)。また、ESAM^{Bright} 細胞の比率は臍帯血サンプルによって大きな差異があることも明らかとなった (図 1B)。

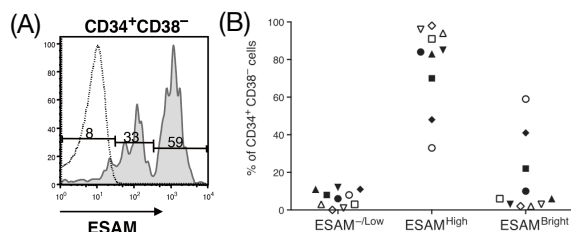


図 1 臍帯血における ESAM 発現

(A) CD34⁺ CD38⁻ 分面の ESAM 発現パターン例, (B) 臍帯血サンプルによる ESAM 発現の違い

② CD34⁺ CD38⁻ 分画細胞の ESAM 発現の機能的意義の解析

ESAM 発現強度を指標に、CD34⁺ CD38⁻ 細胞を ESAM^{Low} と ESAM^{High} の 2 分画に分け、コロニーアッセイ、MS5 との共培養実験により造血幹前駆細胞機能を解析したところ、ESAM^{High} 分画により未分化な前駆細胞が濃縮されていることが明らかとなった。臍帯血の ESAM^{Bright} 細胞が ESAM^{High} 細胞より強い造血幹前駆細胞活性を持っているかを検討するため、CD34⁺ CD38⁻ ESAM^{High} 細胞と ESAM^{Bright} 細胞を分取し、コロニーアッセイ、MS5 との共培養実験を行ったところ、未分化な造血幹前駆細胞は骨髄や G-CSF 動員後の末梢血と同様に、ESAM^{High} 分画に濃縮されていることが明らかとなった。また、表面マーカー解析、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析、培養実験の結果、臍帯血中に認められた ESAM^{Bright} 細胞は血管内皮系に関連する細胞であることが示唆された。

③ ESAM 発現を指標とした臍帯血造血幹細胞の純化効率の向上

臍帯血の CD34⁺ CD38⁻ 分画を ESAM 発現強度を指標として、ESAM^{Low}、ESAM^{High}、ESAM^{Bright} の 3 分画に分け、免疫不全マウス (NOG マウス) へ移植して長期の造血再構築能を解析した。3 ヶ月後の解析では、ESAM^{High} 分画を移植したマウスにおいてのみヒト血球の生着、骨髄球系・B リンパ球系・T リンパ球系の 3 系統の血球産生が認められた (図 2)。一次移植レシピエントの骨髄を NOG マウスへ二次移植し、さらに 4 ヶ月後の骨髄を解析した結果、二次移植レシピエントにおいてもヒト血球の生着と 3 系統の血球産生が認められた。このことから、ESAM 発現強度を指標とすることで造血幹細胞をより濃縮で

きる事が明らかとなった。

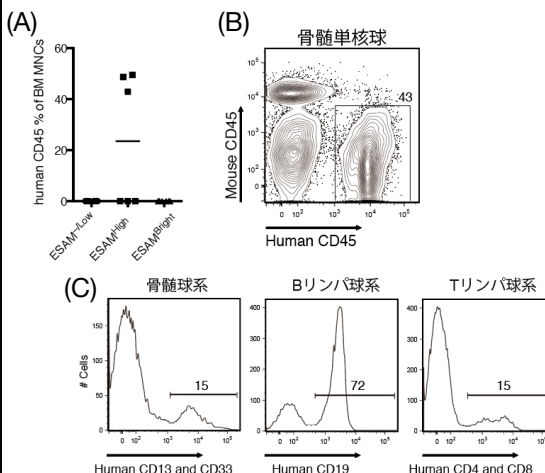


図 2 一次移植レシピエントの骨髄解析

(A) ヒト CD45 細胞比率, (B)(C) フローサイトメトリー解析例

④ ヒト白血病細胞における ESAM 発現パターンの解析

ヒト白血病細胞株のフローサイトメトリー解析では、赤血球系や巨核球系の細胞株では ESAM 発現を認めた一方、骨髄球系やリンパ球系の細胞株では ESAM 発現が認められなかった。これに対して白血病症例の解析では、急性リンパ性白血病では ESAM 発現がみられなかったのに対して、急性骨髄性白血病の多くで ESAM 発現がみられ、ESAM は白血病の系統診断にも有用である可能性が示唆された。同一の病型の急性骨髄性白血病でも、症例によって ESAM 発現には違いがあることも分かった。ESAM 発現と臨床的特徴との関連については今後明らかにしていく必要がある。

⑤ ヒト白血病細胞における ESAM 発現の機能的意義の解析

ヒト急性骨髄性白血病細胞株である KG-1a 細胞を免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) へ移植した後、生着した KG-1a 細胞を解析すると、移植前には陰性だった ESAM の発現が上昇していることが明らかとなった。ESAM 発現上昇の意義を検討するため、生着した KG-1a 細胞の ESAM 陰性分画と陽性分画を分取し NOD/SCID マウスへ移植したところ、ESAM 陽性分画を移植したマウスでのみ KG-1a 細胞の生着が認められた。このことから、白血病細胞の ESAM 発現は骨髄環境への親和性に関係していることが示唆された。

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 10 件)

1. 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. *Exp Hematol.* 44(4):269-81.e1. (2016) doi: 10.1016/j.exphem.2015.12.010. 査読有
 2. 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(4):e0154189. (2016) doi: 10.1371/journal.pone.0154189. 査読有
 3. Shimomura Y, Mitsui H, Yamashita Y, Kamae T, Kanai A, Matsui H, Ishibashi T, Tanimura A, Shibayama H, Oritani K, Kuyama J, Kanakura Y. New variant of acute promyelocytic leukemia with IRF2BP2-RARA fusion. *Cancer Sci.* 107(8):1165-8. (2016) doi: 10.1111/cas.12970. 査読有
 4. Yokota T, Kanakura Y. Genetic abnormalities associated with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci.* 107(6): 721-5. (2016) doi: 10.1111/cas.12927. 査読有
 5. 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(5):1390-401. (2015) doi: 10.1002/eji.201444939. 査読有
 6. 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. *Exp Hematol.* 43(11):963-973.e4. (2015) doi: 10.1016/j.exphem.2015.07.002. 査読有
 7. Sudo T, Yokota T, Kanakura Y. Role of endothelial antigen ESAM in activated hematopoietic stem cells. *Rinsho Ketsueki.* 56(5):464-74. (2015) doi: 10.11406/rinketsu.56.464. 査読有
 8. 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
 9. Yokota T, Kanakura Y. Role of tissue-specific AT-rich DNA sequence-binding proteins in lymphocyte differentiation. *Int J Hematol.* 100(3):238-45. (2014) doi: 10.1007/s12185-014-1602-2. 査読有
 10. 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(6):1791-801. (2014) doi: 10.1002/eji.201344239. 査読有
- [学会発表] (計 11 件)
1. Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M, Nakaoka Y, Kanakura Y. Endothelial antigen ESAM is a human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias. 第 24 回日本血管生物医学学会学術集会. 2016.12.8-10 (発表日 12.9), 長崎ブリックホール, 長崎
 2. Ueda T, Yokota T, Shingai Y, Doi Y, Ishibashi T, Sudo T, Nagate Y, Tanimura A, Tokunaga M, Fujita J, Ichii M, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule (ESAM) Is Required for the Ontogeny of Definitive Hematopoietic System in Mice. The American Society of Hematology 58th Annual Meeting. 2016.12.3-6 (発表日 12.4), San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA
 3. 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, 上田智朗, 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. 血管内皮抗原 ESAM はヒト造血幹細胞マーカーであり白血病研究にも有用である. 第 78 回日本血液学会学術集会. 2016.10.13-15 (発表日 10.13), パシフィコ横浜, 神奈川
 4. 上田智朗, 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. 第 78 回日本血液学会学術集会. 2016.10.13-15 (発表日 10.13), パシフィ

コ横浜, 神奈川

5. Hamanaka Y, Shibayama H, Tanimura A, Yokota T, Ezoe S, Ichii M, Ishibashi T, Doi Y, Nagate Y, Oritani K, Kanakura Y. Anamorsin is essential for B-cell terminal differentiation. 21st Congress of the European Hematology Association. 2016.6.9 - 12 (発表日 6.11), Bella Center, Copenhagen, Denmark
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. Endothelial antigen ESAM is a human HSC marker associated with a subset of human leukemias. 第14回幹細胞シンポジウム. 2016.5.20-21 (発表日 5.21), 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場, 兵庫
7. 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. The American Society of Hematology 57th Annual Meeting and Exposition. 2015.12.5-8 (発表日 12.5), The Orange County Convention Center, Orlando, FL, USA
8. 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. International Society for Experimental Hematology 44th Annual Meeting. 2015. 9.17 - 9.19 (発表日 9.18), Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan
9. 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. The American Society of Hematology 56th Annual Meeting. 2014.12.6 - 9 (発表日 12.8), Moscone Center, San Francisco, CA, USA
10. 数藤孝雄, 横田貴史, 奥崎大介, 一井倫子, 石橋知彦, 磯野友美, 土居由貴子, 竹本雅子, 羽瀧洋子, 谷村 朗, 江副幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓. ESAM on hematopoietic cells is essential for recovery of erythropoiesis after bone marrow injury. 第76回日本血液学会学術集会. 2014.10.31-11.2 (発表日 11.1), 大阪国際

会議場, 大阪

11. 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, 齊藤則充, 江副幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓. 血管内皮抗原 ESAM は幹細胞ソースに関わらずヒト造血幹細胞のマーカーとなる. 第76回日本血液学会学術集会. 2014.10.31-11.2 (発表日 10.31), 大阪国際会議場, 大阪

[その他]

ホームページ : <http://www.hematology.pro>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 知彦 (ISHIBASHI, Tomohiko)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員
研究者番号 : 30722285

(2) 研究分担者

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 : 60403200

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 : 70324762

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 : 20177489