



Title	The Endothelial Antigen ESAM Monitors Hematopoietic Stem Cell Status between Quiescence and Self-Renewal
Author(s)	數藤, 孝雄
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59817
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	す どう たか お	藤 孝 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)	
学 位 記 番 号	第 2 5 6 6 1 号	
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 9 月 25 日	
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当	
	医学系研究科内科系臨床医学専攻	
学 位 論 文 名	The Endothelial Antigen ESAM Monitors Hematopoietic Stem Cell Status between Quiescence and Self-Renewal	
	(血管内皮抗原 ESAM の発現は造血幹細胞の活性化状態を反映する)	
論 文 審 査 委 員	(主査)	
	教 授 金倉 譲	
	(副査)	
	教 授 高倉 伸幸 教 授 竹田 潤二	

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

造血幹細胞表面に発現する分子は、状況に応じて変化する。定常状態と骨髓抑制後の造血回復時を比較すると、造血幹細胞(HSC)の性質の変化とともに、表面抗原の発現パターンも大きく異なる。造血幹細胞の新規マーカー—endothelial cell selective-adhesion molecule (ESAM) は、もともと血管内皮特異的に発現する分子としてクローニングされたが、継続した研究で、マウスの胎生期から成獣期を通じて造血幹細胞に発現することが明らかになっている。成獣マウスにおける造血幹細胞上のESAMの発現は、胎生期と比較すると減弱する。骨髓ストレス後のESAM発現がどのように変化するのかを調べ、その発現が造血幹細胞の機能にどのような意義を持つのかを検討した。

〔 方法ならびに成績 〕

C57/B6マウスに150mg/kgの5-FUを静脈内投与し、フローサイトメトリーを用いて造血幹細胞が濃縮されるLineage⁻ c-kit⁺ Sca1⁺ (LSK)分画におけるESAMの発現を検討した。その結果として、5-FU投与後3日目から9日目まではESAMの著明な発現上昇を認め、12日目には定常状態のレベルに戻っていた。上昇のピークは5日目で、定常状態の約11倍の発現が見られた。このESAMの造血幹細胞上での発現上昇は、他の血管内皮抗原 (CD34、Tie2、Endoglin) の発現上昇と比較しても顕著であった。LSK分画において、ESAMとSLAMマーカー (CD48、CD150)との関係を見たところ

ろ、CD48⁻ CD150⁺分画の割合は、ESAMの発現が高いほど多く、未分化造血幹細胞はESAMを高発現する細胞集団に濃縮されることが示唆された。

次に5-FU投与5日目の骨髓中からESAM^{Lo} LSK細胞とESAM^{Hi} LSK細胞を採取し、この二つの細胞集団を比較する機能解析を行った。コロニーアッセイにおいては、ESAM^{Hi} LSK細胞の方から有意に多くの未分化な前駆細胞であるCFU-Mixが出現した。また致死性放射線を当てたマウスに、ESAM^{Lo} LSK細胞またはESAM^{Hi} LSK細胞を移植し、移植した細胞分画の長期生着率を比較したところ、ESAM^{Hi} LSK細胞の方が有意に高かった (ESAM^{Lo} 11% vs ESAM^{Hi} 32%)。以上よりESAMを高発現するLSK細胞は、長期骨髓再構築能を持つと考えられた。

次にフローサイトメトリーを用いてcell-cycleの検討を行った。5-FU投与5日目の骨髓中ESAM^{Lo} c-kit⁺ Sca1⁺細胞とESAM^{Hi} c-kit⁺ Sca1⁺細胞を比較すると、ESAM^{Hi} c-kit⁺ Sca1⁺の方が、G0期の細胞が減少する (ESAM^{Lo} 10% vs ESAM^{Hi} 2%)とともに、12時間のBrdUの取り込みが増加 (ESAM^{Lo} 24% vs ESAM^{Hi} 38%)していた。このことから、ESAMを高発現する造血幹細胞はcell-cycleが活性化していると考えられたさらに免疫染色により、この活性化したESAMを高発現する造血幹細胞の多くは、骨髓中の血管内皮近傍に存在していることが確認され、血管内皮との相互作用をしている可能性が考えられた。

ESAMの造血回復時における機能を検討するため、野生型マウスとESAM欠損マウスに5-FUを投与するという実験を行った。ESAM欠損マウスは、野生型マウスに比して骨髓抑制が著明であった。また、5-FU投与後の生存率が低下していた (野生型100% vs 欠損型67%)。

ESAMの転写調節機構を検討するために、ESAM遺伝子のexon1の上流を調べたところ、NF-κBとtopoisomeraseIIが作用する配列が存在した。5-FU投与後のマウスに、NF-κB阻害薬とtopoisomeraseII阻害薬を同時に投与したところ、造血幹細胞上のESAMの発現上昇が著明に抑えられたことから、NF-κBとtopoisomeraseIIは協調的にESAMの発現上昇に関与すると考えられた。

[総 括]

ESAMは造血幹細胞の有用な活性化マーカーと考えられる。さらに、ESAMは正常造血回復に機能的に重要である。

論文審査の結果の要旨

筆者らは本論文において、血管内皮関連マーカー endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM) が5-FU投与後の造血幹細胞分画に高発現し、さらにESAM高発現造血幹細胞はcell cycleが活性化していることを示した。このことからESAMは造血幹細胞の有用な活性化

マーカーと考えられた。また、長期造血幹細胞がESAMを高発現する細胞集団に濃縮されることを示し、これらの多くが血管内皮近傍に存在することを明らかにした。さらに、ESAMは骨髓抑制後の正常造血回復に機能的に重要であることを示した。ESAMの発現を内的に制御する因子として、NF-κBとトポイソメラーゼIIを見出した。本論文から明らかにされたことにより、活性化造血幹細胞の性質に対する理解が深まるとともに、その分離法について新たな知見を見出すことができることから、博士(医学)の学位授与に値すると考えられる。