

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

シアロムチン PCLP1 による脈管内皮幹細胞の分離とその培養系を用いた血管／リンパ管の再生医療の基盤技術の確立に関する研究

平成 17 年度 総括研究報告書
主任研究者 宮島 篤
平成 18 (2006) 年 3 月

目 次

I	総括研究報告	
	シアロムチン PCLP1 による脈管内皮幹細胞の分離とその培養系を用いた 血管／リンパ管の再生医療の基盤技術の確立に関する研究	
	宮島 篤	1
II	研究成果の刊行に関する一覧表	14
III	研究成果の刊行物・別刷	16

I. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

シアロムチン PCLP1 による脈管内皮幹細胞の分離とその培養系を用いた血管／リンパ管の再生医療の基盤技術の確立に関する研究

主任研究者 宮島 篤 東京大学分子細胞生物学研究所・教授

研究要旨：発生過程で造血細胞と内皮細胞は共通の前駆細胞であるヘマンジオブラストから分化すると考えられている。我々はマウス大動脈-生殖原基-中腎(Aorta-Gonad-Mesonephros: AGM)領域の解析から、シアロムチン PCLP1 がヘマンジオブラストに発現していることを示した。さらに胎児期に造血系／内皮系細胞が増殖する主要な臓器であるマウス胎児肝臓より PCLP1 強陽性 (PCLP1^{high}) 細胞を分離し、OP9 ストローマ細胞との共培養系および細胞移植により性状を検討した。その結果、PCLP1^{high} 細胞は、造血系／血管内皮系細胞の表面抗原を発現していなかったが、リンパ管内皮系遺伝子を発現しており、OP9 細胞上で著しい増殖性を示した。細胞移植の結果、PCLP1^{high} 細胞は培養前でも培養して増幅した後も生体内の様々な臓器の血管内皮細胞となった。よって、PCLP1^{high} 細胞は非常に未分化な脈管内皮前駆細胞を含む細胞集団であり、脈管内皮再生医療に有用な細胞材料となり得ると考えられる。

A.研究目的

循環系は、心臓、動脈、毛細血管、リンパ管、静脈から構成される全身にひろがる組織であり、存在部位によって機能的にも組織構築の点でも様々な違いがある。これらの組織の最内層にあつて内部を流れる血液やリンパと接している内皮細胞は、血液／リンパと組織間の細胞や液性成分の透過性の調節などに重要な働きをしており、部位によってその機能／性状は大きく異なっている。例えば肝臓では、類洞と呼ばれる特殊な血管系があり、動脈血と消化管からの静脈血が混ざりあつて緩やかに流れている。類洞内皮細胞は不完全な基底膜を持ち細胞間に間隙があり、それによって肝細胞との間で活発な物質交換が行われている。

このほかにも脳、肺、腎臓などの臓器で、それぞれの組織に特化した内皮細胞が存在することが主に解剖学／生理学的に明らかにされてきた。しかし、内皮細胞の細胞レベル／分子レベルでの性状には不明な点が多い。

これまでの研究で、血管内皮細胞／リンパ管内皮細胞と造血細胞は共通の前駆細胞であるヘマンジオブラストから分化すると考えられている。また、血管の形成には主に胎児期に血管内皮前駆細胞から新たに血管が作られる脈管形成(Vasculogenesis)と既存の血管の分枝・伸長により血管が増殖していく血管新生(Angiogenesis)の二つの過程があることが示されてきた。さらに成体の末梢血中には骨髓細胞由来の血管内皮前

駆細胞が存在し、血管新生だけでなく脈管形成にも寄与していることが明らかにされた。しかし、発生学的に起源を同じくする造血系では造血幹細胞から様々な前駆細胞を経て分化した血球に至る過程が増殖因子や表面抗原の解析から明らかにされているのに対して、血管内皮前駆細胞および体内に存在する多種多様な血管内皮の表面抗原や分化/増殖のメカニズムについては今なお不明な点が多い。

我々は、胎生 11.5 日 (E11.5) のマウス胚において成体型造血幹細胞の発生部位である大動脈-生殖原基-中腎(Aorta-Gonad-Mesonephros: AGM)領域の解析を行い、CD34 ファミリーに属するシアロムチン PCLP1 (図 1-1) が、血管内皮細胞と血液細胞との共通の前駆細胞であるヘマンジオブラストに発現していることを示した (図 1-2)。さらに、胎児期の主要な造血器官である胎児肝臓で PCLP1 の発現を検討した結果、PCLP1 の発現強度と細胞の大きさによって、E14.5 胎児肝臓細胞は明確に異なる 4 つの細胞集団に分離された。これらの細胞集団を PCLP1^{neg}、PCLP1^{dull}、PCLP1^{med} および PCLP1^{high} と命名した。E14.5 胎児肝臓におけるこれらの頻度はそれぞれ約 10%、40%、40%、0.2-0.5%であった。このような単一抗原による細胞集団の分離は、同じシアロムチンファミリーに属する CD34 では不可能であり、PCLP1 に特有の現象であった。血液学的な検討から、様々な段階の血液細胞は PCLP1^{neg}、PCLP1^{dull} および PCLP1^{med} に含まれていた。一方、マウス胎児肝臓に含まれる PCLP1 を強く発現している PCLP1^{high} (図 2) 細胞が、次のような特徴を示すことを見いだした。

- 1) 造血活性がない。
- 2) 内皮細胞に特徴的な抗原分子を発現していない。
- 3) リンパ管内皮に特徴的な遺伝子を発

現している。

- 4) *in vivo* で血管内皮細胞となる。
- 5) 血球/血管内皮細胞の分化・増殖支持活性を有する OP9 ストローマ細胞上で、高い増殖性を示す。

これらの特徴から PCLP1^{high} 細胞は、内皮細胞にコミットした未分化な前駆細胞集団であることが示唆され、これを解析することで内皮細胞の増殖/分化機構の理解を深め、細胞療法への応用が期待できる。

体内の様々な血管内皮は、それらが存在する周囲の組織との相互作用によって特有の機能/構造へと分化すると考えられる。胎児期の肝臓は、成体における骨髄に相当する造血系/内皮系細胞の供給源である。一方、成体の循環系において肝臓は血液中の主要なタンパク質、脂質、糖など液性成分の供給源である。このために肝臓は類洞と呼ばれる特殊な血管網が発達して液性成分を合成する肝細胞をはさむ構造をとる。このように類洞内皮細胞は構造的/機能的に極めて特化した血管内皮細胞である。胎児肝臓は短期間に循環系での細胞供給源から液性成分の供給源へと変化し、それに伴って血管内皮へも分化することから内皮細胞の発生生物学にとっては非常に興味深い臓器である。我々は、肝血管系の発生を内皮細胞が多様性を獲得するモデルとして捉え、その制御機構の解明を目的として研究を行った。既存のマーカー遺伝子を用いて成体マウスより肝類洞内皮細胞を含む細胞画分を分離し網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、データベースに公開されているデータを利用することで、他の組織や細胞では発現がほとんど認められず肝類洞内皮細胞を含む画分で強く発現する遺伝子を抽出した。それら遺伝子の中には肝類洞内皮細胞の特徴であるヒアルロン酸の取込みに関わる膜蛋白質、Stabilin-2 (Stab2) が含まれていた。そこでこの分子に注目し、マ

ウス Stab2 に対するモノクローナル抗体を作製した。Stab2 の発現は肝臓、脾臓、骨髄などの洞様毛細血管に限局しており、我々の作製した抗 Stab2 抗体によってこれらの高度に分化した血管内皮細胞を分離することができる。肝臓は、胎児期には造血系／内皮系細胞が増殖する臓器であり、次第に成体で見られる類洞を形成していく。さらに成体肝臓は、灌流法によって容易に実質細胞である肝細胞と類洞内皮細胞を含む非実質細胞とを分離できるため、存在頻度の低い内皮細胞を解析する上で非常に良いモデル臓器となる。本抗体を用いることで、肝臓では肝類洞内皮細胞を含む洞様毛細血管内皮細胞とその他の内皮細胞とを分離識別することが可能となった (図 4)。

平成 17 年度は、脈管内皮細胞システムの起点と考えられる PCLP1^{high} 細胞および分化した血管内皮の一つである肝臓 Stab2 陽性類洞内皮細胞の性状をさらに詳細に検討した (図 3、4)。胎生期の肝臓は急速に機能的な変化を遂げる臓器である。胎児肝臓はまず胎児期の主要な造血器官として働き、次第に代謝臓器としての機能を獲得するとともに造血機能を失っていく。我々は、最も造血が盛んな E14.5 肝臓を用いて、全細胞数の約 0.5% 以下の頻度で含まれる PCLP1^{high} 細胞の性状を検討した。フローサイトメトリー法では、血管内皮細胞および血液細胞で発現している抗原分子を発現していなかった。RT-PCR 法による遺伝子発現解析でも内皮細胞の抗原分子は発現しておらず、リンパ管発生に関与する転写因子およびリンパ管内皮細胞で発現している遺伝子を検出した。これらの結果から、PCLP1^{high} 細胞は、これまでに報告されている血管内皮系細胞とは大きく異なる性質を持つことが明らかになった。この PCLP1^{high} 細胞は、血球／血管内皮細胞の分化・増殖支持活性を持つことで知られる

OP9 ストローマ細胞との共培養によって、内皮様のコロニーを形成し、数十倍に増幅した。培養条件を検討した結果、これらのコロニーで Stab2 を含む血管内皮細胞関連抗原の発現を誘導することができた。さらに、培養後の細胞をマウス新生児肝臓へ移植した結果、培養前の細胞と同様に小腸、腎臓などの臓器でドナー由来細胞が血管内皮細胞として生着していることを認めた。したがって、PCLP1^{high} 細胞は OP9 共培養系で増幅した後も、培養前と同様に *in vivo* で血管内皮細胞への分化能を保つことが可能であり、培養条件によっては *in vitro* でより分化した血管内皮細胞の性状を誘導できることが明らかとなった。

また、胎児期から成体肝臓に含まれる Stab2 陽性内皮細胞で内皮関連抗原の発現を検討した。その結果、発生過程で内皮関連抗原の発現レベルは変化しており、胎児期から成体での肝臓の機能的な変化とともに肝臓特有の毛細血管である Stab2 陽性内皮細胞の性状も変化すると考えられた。

以上の結果から、PCLP1^{high} 細胞は高い増殖性を持ち、これまでに知られている内皮前駆細胞よりも未分化な分化段階にある細胞であることが示唆された。一方、臓器特異的な毛細血管の分化を Stab2 陽性肝臓類洞内皮細胞で検討することができたことから、肝臓は内皮細胞分化のモデル臓器として有用であると考えられる。

本研究では、我々が得た知見をさらに発展させ、血管およびリンパ管の分化／増殖メカニズムをより詳細に解析し、血管／リンパ管の再生医療の基盤を確立することを目標とする。

B. 研究方法

1. マウス胎児肝臓 PCLP1^{high} 細胞の性状解析

マウス E14.5 肝臓に少数含まれる

PCLP1^{high} 細胞の性状を、フローサイトメトリー法による表面抗原の解析および RT-PCR 法による遺伝子発現解析により検討した。

2. OP9 共培養系を用いた PCLP1^{high} 細胞の性状解析

PCLP1^{high} 細胞を OP9 ストローマ細胞と共培養すると内皮様のコロニーを形成した。培地に添加するサイトカインの条件によるコロニーの形状変化および内皮関連遺伝子／内皮細胞抗原タンパク質の発現変化を検討した。

3. OP9 共培養系により増幅した PCLP1^{high} 細胞の *in vivo* での機能解析

GFP トランスジェニックマウス胎児肝臓より PCLP1^{high} 細胞を精製し、OP9 共培養による増幅後、マウス新生児肝臓へ移植した。8週間後に解剖して、ドナー由来細胞の内皮系への寄与を組織化学的に検討した。

4. 胎児肝臓共培養系を用いた PCLP1^{high} 細胞の培養系の検討

これまでに我々は、AGM 領域由来の造血幹細胞を胎児肝臓細胞と共培養して造血幹細胞を増幅する系を確立している。これを用いて、胎児肝臓 PCLP1^{high} 細胞を胎児肝臓細胞と共培養して、OP9 共培養系と同じく内皮様のコロニーを形成するかを検討した。

5. ストローマ細胞非依存的な *in vitro* 増幅系の確立

in vitro で増幅した血管／リンパ管内皮前駆細胞を細胞療法の方法として医療用に利用するには、拒絶反応等の問題からストローマ細胞非依存的に *in vitro* で増幅できることが望ましい。そこで、OP9 ストローマ細胞を用いることなく PCLP1^{high} 細胞を *in vitro* で増幅する方法を検討した。

6. 肝臓 Stab2 陽性内皮細胞の解析

PCLP1 が未分化な内皮系前駆細胞に発現するのに対して、ヒアルロン酸の取込みに関わることが知られている Stab2 の発現は肝臓、脾臓、骨髄などの洞様毛細血管に限局しており、我々の作製した抗 Stab2 抗体によってこれらの高度に分化した血管内皮細胞を分離できる (図 4)。そこで、胎児肝や成体肝で認められる Stab2 陽性内皮細胞が均一な細胞集団なのかどうかを明らかにすることを目的として、これらの細胞における内皮細胞マーカー遺伝子の発現を検討した。

C. 結果

1. マウス E14.5 肝臓の PCLP1^{high} 細胞の性状

フローサイトメトリー法による解析の結果、マウス E14.5 肝臓の PCLP1^{high} 細胞は、血管内皮細胞および既知の血管内皮前駆細胞での発現が知られている CD31 (PECAM1)、CD34 を発現していなかった。さらに、成体肝臓類洞など洞様毛細血管内皮で発現する Stab2 を発現していなかった (図 3-1)。また、血液細胞で発現している CD45、CD11b (Mac1) も陰性であった。RT-PCR 法による遺伝子発現解析では、CD31、CD34、VE-Cadherin の発現は無く、一方、リンパ管発生に必須の転写因子とされる Prox1 およびリンパ管内皮細胞で発現している Lyve1、Podoplanin を検出した。これらの結果から、PCLP1^{high} 細胞は、これまで報告されている血管内皮系細胞とは異なる細胞集団であると考えられた。

2. OP9 共培養系を用いた PCLP1^{high} 細胞の性状解析

PCLP1^{high} 細胞は OP9 共培養で高い増殖性を示した。各種サイトカイン (SCF,

OSM, bFGF, VEGF-A, VEGF-Cなど) の添加により、PCLP1^{high}細胞がOP9上で形成するコロニーの形態には変化を認めなかったが、細胞の増殖性はSCF, OSM, bFGFを共に添加した際に最も高かった。

RT-PCR 法により遺伝子発現を検討したところ、胎児肝臓から精製したPCLP1^{high}細胞は内皮に発現しているCD31とVE-Cadherinを発現していなかった(図3-2)。OP9共培養によって、サイトカイン無添加でも、あるいは最も増殖性の高かったSCF, OSM, bFGFの存在下やこの条件にさらにVEGF-Aを添加した場合でも、CD31およびVE-Cadherinの発現は誘導されなかった。しかし、VEGF-Aを単独で加えるとこれらの内皮関連遺伝子の発現を誘導することが出来た(図3-2)。さらにOP9共培養後に細胞を回収し、再びフローサイトメトリー法により内皮細胞特異的な抗原分子の発現を解析したところ、培養前は陰性であったCD31, CD34, Lyve-1, Stab2の発現を検出し、また、少数のPCLP1^{high}細胞を認めた。さらにこれらのコロニーの免疫染色の結果、フローサイトメトリーの結果と一致して、少なくとも一部のコロニーはCD31, CD34, PCLP1, Stab2, Lyve-1を発現しており、OP9共培養によってこれらの内皮細胞に特有の抗原分子の発現が誘導されたことが明らかとなった。これらの結果から、PCLP1^{high}細胞はOP9共培養系で自己複製するとともに、より分化した内皮細胞を産生していることが示唆された。

3.OP9共培養により増幅したPCLP1^{high}細胞の*in vivo*での機能解析

GFPトランスジェニックマウス胎児肝臓からPCLP1^{high}細胞を精製し、OP9

と共培養して増幅した細胞をマウス新生児肝臓へ移植し、8週後に各臓器を免疫組織化学法によって検討した。胎児肝臓から精製したPCLP1^{high}細胞を直接移植した場合(図3-3)と同様に、OP9と共培養した細胞を移植した場合(図3-4)でも、移植細胞由来の細胞が形態的に血管内皮でCD31陽性細胞として観察された。ドナー由来細胞が移植した肝臓以外の臓器で移植後8週という時期においても検出されたことから、胎児肝臓PCLP1^{high}細胞は*in vivo*でも高い増殖性を持ち、その増殖性および分化能はOP9との共培養で失われず維持されている事が示された。

4.胎児肝臓共培養系を用いたPCLP1^{high}細胞の培養系の検討

PCLP1^{high}細胞を胎児肝臓細胞と共培養した結果、OP9共培養において観察されるような内皮細胞様のコロニー形成は認められなかった。このことから、造血幹細胞を増幅する方法と同一の胎児肝臓細胞との共培養法では、PCLP1^{high}細胞は増殖できず、内皮細胞様コロニーの増殖に必要な細胞環境は、少なくとも我々の作製した胎児肝臓初代培養系では作り出せなかった。

5.ストローマ細胞非依存的な*in vitro*増幅系の確立

PCLP1^{high}細胞を各種細胞外マトリックス構成成分(ラミニン、コラーゲン、ゼラチン)でコートしたディッシュにて培養することを試みた。その結果、いずれのマトリックスでコートしたディッシュにおいても、PCLP1^{high}細胞は増殖することなく死滅し、培養不可能であった。しかしながら、MesenCult(StemCell technologies社)を用いると、再現性よくストローマ細胞非存在下で高い増殖活性を認めた。現在、MesenCult

を用いて増幅した細胞の性状について解析中である。

6. 肝臓Stab2陽性内皮細胞の解析

胎児期から成体肝臓に含まれる Stab2 陽性細胞で、CD34 や Lyve1 および FcγR の発現は発生段階によって発現レベルが異なっていた。したがって、胎児期と成体の肝類洞内皮細胞は Stab2 陽性であるという点で共通するが、その他のマーカー遺伝子の発現様式は異なっており内皮細胞として分化段階の異なる細胞であることが示唆された。肝類洞内皮細胞は、胎児期からリンパ管内皮細胞のマーカー遺伝子である Lyve1 を発現していた。細胞同士の接着がゆるく物質透過性が高いという肝類洞内皮細胞の特徴はリンパ管内皮細胞と同様であり、その細胞系譜は他の内皮細胞と比べリンパ管内皮に近いことが予想された。そこで、肝類洞内皮細胞とリンパ管内皮細胞を識別可能なマーカー遺伝子を探索した結果、Podoplanin の発現はリンパ管内皮細胞においてのみ認められ、肝類洞内皮細胞においては胎児期から成体まで認められないことが明らかとなった。したがって、肝類洞内皮細胞とリンパ管内皮細胞は Podoplanin の発現により分離・識別が可能であることが示唆された (図5)。

D. 考察

本年度の研究により、マウス E14.5 胎児肝臓の PCLP1^{high} 細胞は既知の内皮前駆細胞とは異なる未分化な内皮系前駆細胞としての性質を有する事が確認できた。特に、OP9 との共培養による増幅後も PCLP1^{high} 細胞は未分化な内皮系前駆細胞としての活性を維持可能であることを移植実験で示すことができ、*in vitro* で種々の血管内皮抗

原の発現を誘導することができたことから、これまでに報告されていない最も未分化な内皮系前駆細胞として内皮系細胞の分化階層性のなかで重要な位置にあると考えられる。しかしながら、OP 細胞との共培養による PCLP1^{high} 細胞の安定した増幅、さらに医療への応用を考慮すると、ストローマ細胞に非依存的な *in vitro* 増幅系の確立が望まれる。そこで、そうしたストローマ細胞に依存しない培養系の確立を検討している。これまでの解析では、最も造血が盛んな E14.5 胎児肝臓を中心に検討してきたが、PCLP1^{high} 細胞はマウス胎児期全般にわたり造血組織 (AGM 領域、肝臓、脾臓) に共通して存在していた。また、抗ヒト PCLP1 モノクローナル抗体を用いて、ヒト臍帯血からも PCLP1 陽性細胞を検出できており、これらは CD34 陰性であり造血前駆細胞活性を持たないという点でマウス胎児肝臓の PCLP1^{high} 細胞の性状と類似している。現在、これらのヒト臍帯血 PCLP1 陽性細胞について、増殖性および内皮細胞への分化活性を検討中である。

一方、我々は抗 Stab2 抗体を作製し、これを利用して脈管内皮細胞の階層のなかで高度に分化した洞様毛細血管内皮細胞を分離することができた。肝血管系の発生を内皮細胞多様性獲得のモデルとして捉え、Stab2 陽性肝類洞内皮細胞に発現する表面抗原を解析した結果、胎児期からリンパ管内皮細胞のマーカー遺伝子である Lyve1 を発現しており、Podoplanin の発現で肝類洞内皮細胞とリンパ管内皮細胞を区別できることを見いだした。肝臓は物質代謝の中心臓器として捉えられてきたが、同時に循環系としては血漿成分やリンパの産生を行う巨大な脈管臓器である。我々の結果は、肝臓の機能に重要な役割を果たす高度に分化した類洞内皮細胞はリンパ管内皮に近い性質を持つことを意味しており、脈管内皮細

胞の階層性を考える上で新しい知見と考えている (図 5)。

我々は、以上の研究を進めていくことによって、造血系に比べて未知の部分が多く残されている脈管内皮系の増殖/分化階層性とその分子機序を、起点となる脈管内皮前駆細胞と終点の一つである洞様毛細血管との両端から解明し、脈管の再生医療の基盤を確立できると考えている。

E. 結論

我々の発見した PCLP1^{high} 細胞は、これまで知られている内皮前駆細胞よりも未分化な分化段階にあり高い増殖性を持つ細胞であることが明らかになった。さらに、PCLP1^{high} 細胞は *in vitro* で未分化な内皮系前駆細胞活性を維持しつつ培養可能であることから、これらに対して遺伝子導入できる可能性があり、基礎研究のみならず遺伝子治療などへの医療応用面でも有用性が高いと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Iwatsuki K., Tanaka K., Kaneko T., Kazama R., Okamoto S., Nakayama Y., Ito Y., Satake M., Takahashi S., Miyajima A., Watanabe T., and Hara T. Runx1 promotes angiogenesis by down-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3. *Oncogene* 23, 1129-1137, 2005.

Bando T., Sekine K., Kobayashi S., Watanabe A., Rump A., Tanaka M., Suda Y., Kato S., Manabe T., and Miyajima A. Neuronal leucine-rich repeat protein 4 is required for hippocampus-dependent long-lasting

memory. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4166-4175, 2005.

Okaya A., Kitanaka J., Kitanaka N., Satake M., Kim Y., Terada K., Sugiyama T., Takemura M., Fujimoto J., Terada N., Miyajima A., and Tsujimura T. Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am. J. Pathology* 166, 709-719, 2005.

Kato Y., Iwama A., Tadokoro Y., Shimoda K., Minoguchi M., Akira S., Tanaka M., Miyajima A., Kitamura T., and Nakauchi H. Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J. Exp. Med.* 202: 169-179, 2005.

Doyonnas R., Nielsen J.S., Chelliah S., Drew E., Hara T., Miyajima A., and McNagny K.M. Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood* 105, 4170-4178, 2005.

Inukai T., Inaba T., Dang J., Kuribara R., Ozawa K., Miyajima A., Wu W., Look A.T., Arinobu Y., Iwasaki H., Akashi K., Kagami K., Goi K., Sugita K., and Nakazawa S. TEF, an antiapoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by down-regulating expression of the common chain of cytokine receptors. *Blood* 105, 4437-4444, 2005.

Kojima N., Shiojiri N., Sakai Y., and Miyajima A. Expression of neuritin during liver maturation and regeneration. *FEBS Letters*

579. 4562-4566, 2005.

Noguchi T., Fujimoto H., Sano H., Miyajima A., Miyachi H., and Hashimoto Y. Angiogenesis inhibitors derived from Thalidomide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 5509-13, 2005.

Ito T., Arimatsu N., Takeuchi M., Kawamura N., Nagata M., Saso K., Akimitsu N., Hashimoto H., Natori S., Miyajima A. and Sekimizu K. Transcription elongation factor SII is required for definitive hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* in press.

Takeuchi M. and Miyajima A. Hematopoiesis in Fetal Liver. *Pluripotent Hematopoietic Stem Cells* (Ed. J. Keller) ISBN: 1-58706-182-1, 2005.

鬼塚和泉、竹内眞樹、宮島篤
哺乳類の胚発生における造血と成体型造血
幹細胞の起源
別冊・医学の歩み 血液疾患 -State of arts
Ver.3, 6-8 (2005)

竹内眞樹、宮島篤
肝臓における造血ニッチー胎生期造血ー
分子細胞治療 Vol.5 no.2, 11-17 (2006)

学会発表

宮島 篤、峯畑 健一、竹内 眞樹、神谷
淑子

オンコスタチンMによる造血環境の制御
学会名：第3回幹細胞シンポジウム
会場：兵庫県立淡路夢舞台国際会議場
会期：平成17年4月21日～23日

鬼塚 和泉、岡部 智也、矢原 一郎、竹
内 眞樹、宮島 篤

PCLP1の発現レベルの違いによる血球/
血管内皮前駆細胞の同定

学会名：第3回幹細胞シンポジウム
会場：兵庫県立淡路夢舞台国際会議場
会期：平成17年4月21日～23日

Atsushi Miyajima, Naoki Tanimizu, Koji
Nakamura, Hiroki Saito, and Minoru Tanaka
Characterization of fetal and adult hepatic
progenitors

ISSCR (International Society for Stem Cell
Research) 3rd Annual meeting, San Francisco,
U.S.A, 2005.6.23-25

野中 秀紀、菅野 純夫、宮島 篤
ヒアルロン酸受容体 Stabilin-2 の発現を指
標にした肝類洞内皮細胞の分離・識別
学会名：第12回肝細胞研究会
会場：東京大学医学部鉄門記念講堂
会期：平成17年7月8日～9日

鬼塚和泉、岡部智也、矢原一郎、竹内眞樹、
宮島篤
胎児肝臓におけるストローマ細胞依存性血
球前駆/血管内皮前駆細胞の同定
学会名：第67回日本血液学会総会
会場：パシフィコ横浜
会期：平成17年9月17日～19日

Atsushi Miyajima
Characteristics of hematopoietic stem cells and
liver stem cells

8th A-IMBN (Asia-Pacific International
Molecular Biology Network) Conference in
HCMC, Unification Palace, Ho Chi Minh
City, Vietnam, 2005.10.27-29

Takahiro Ito, Nagisa Arimitsu, Masaki
Takeuchi, Nobuyuki Kawamura, Makiko
Nagata, Shunji Natori, Atsushi Miyajima,

and Kazuhisa Sekimizu

Transcription elongation factor S-II is required
for fetal liver erythropoiesis

学会名：第 78 回日本生化学会大会

会場：神戸国際会議場 他

会期：平成 17 年 10 月 19 日～22 日

江指 永二、伊藤 寛明、宮島 篤

オンコスタチン M 遺伝子欠損マウスにお
ける Th1/Th2 バランスの異常

学会名：第 35 回日本免疫学会総会

会場：パシフィコ横浜

会期：平成 17 年 12 月 13 日～15 日

伊藤 寛明、江指 永二、秋山 泰身、井
上 純一郎、宮島 篤

胸腺上皮細胞由来の IL-18 は胸腺樹状細胞
の分化を誘導する

学会名：第 35 回日本免疫学会総会

会場：パシフィコ横浜

会期：平成 17 年 12 月 13 日～15 日

Izumi Onitsuka, Masaki Takeuchi, Atsushi
Miyajima

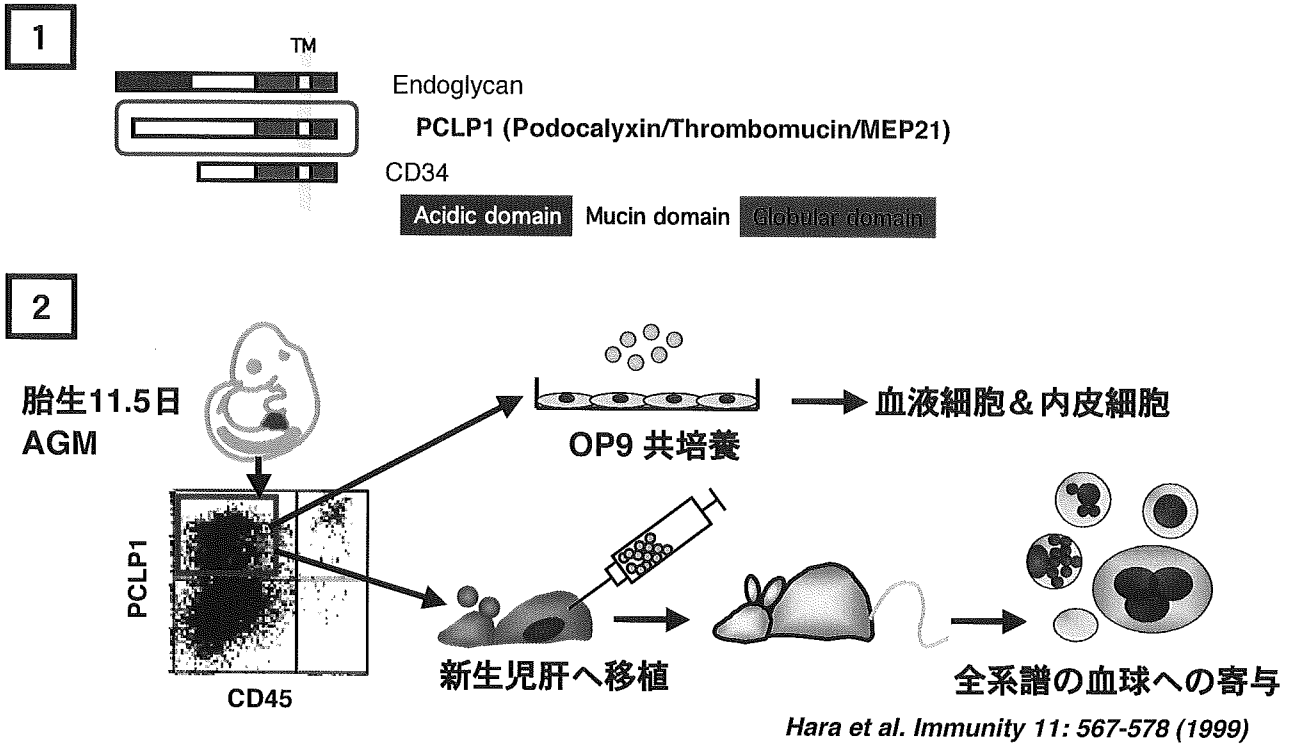
Two distinct precursors of hematopoietic stem
cells and endothelial progenitors
characterized by the PCLP1 expression

American Society for Hematology 47th
annual Meeting, 2005.12.10-13, Atlanta,
U.S.A

H.知的財産の出願・登録状況

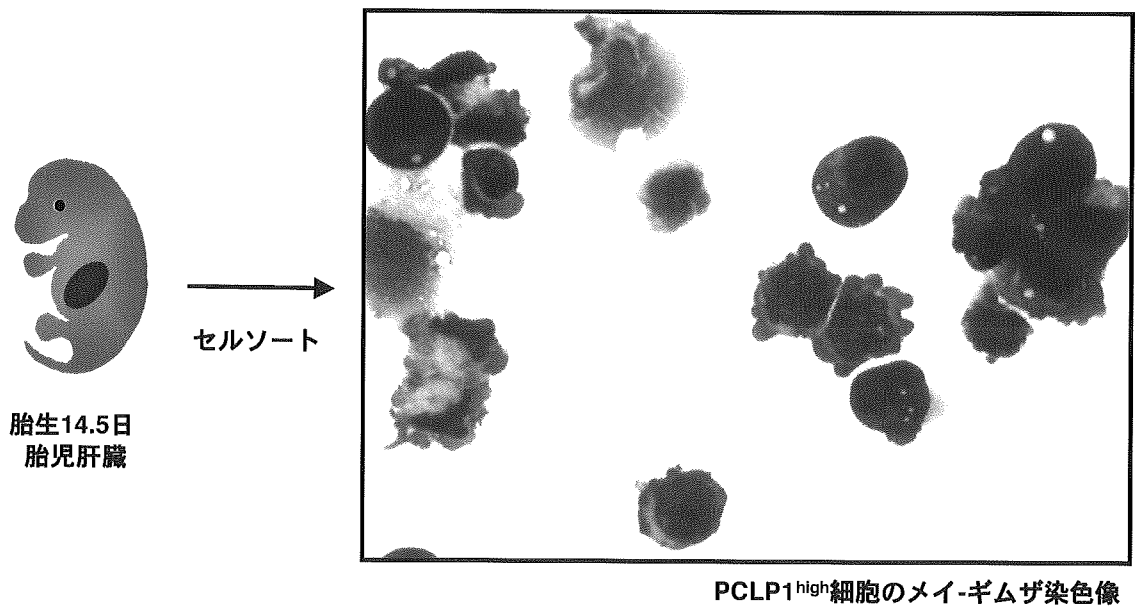
1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図 1 : PCLP1の研究背景



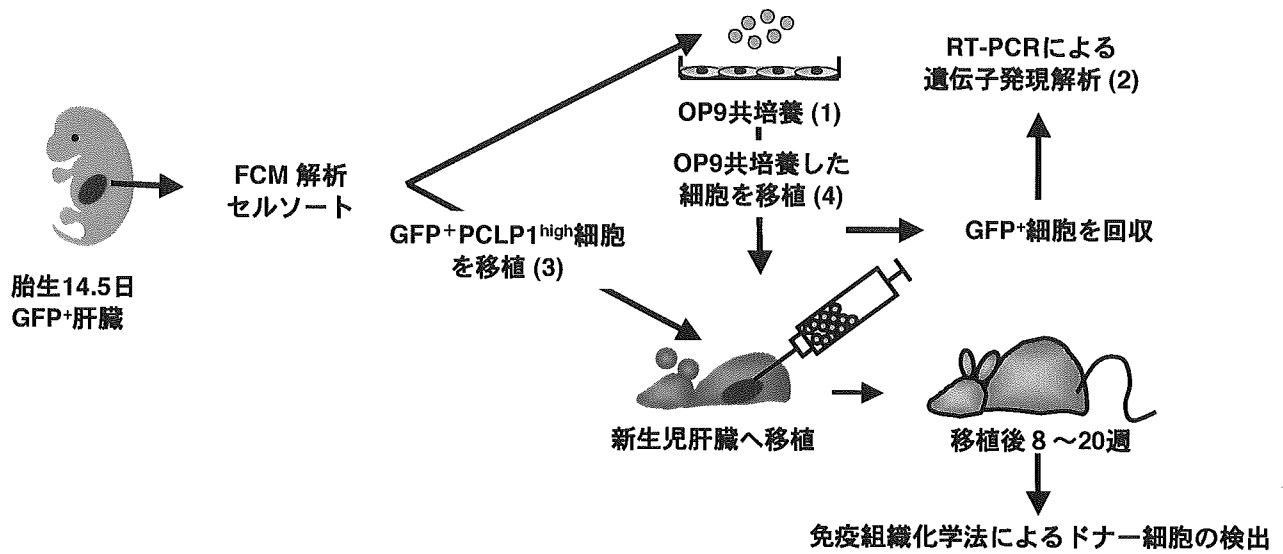
- (1) PCLP1はCD34と同じくシアロムチンファミリーに属する糖タンパク質である。
- (2) OP9共培養系及びマウス新生児肝への移植実験の結果、AGM領域のPCLP1⁺CD45⁺細胞集団にはヘマンジオブラストが含まれると考えられた。

図 2 : 胎生14.5日肝臓には0.2-0.5%のPCLP1^{high}細胞が存在する



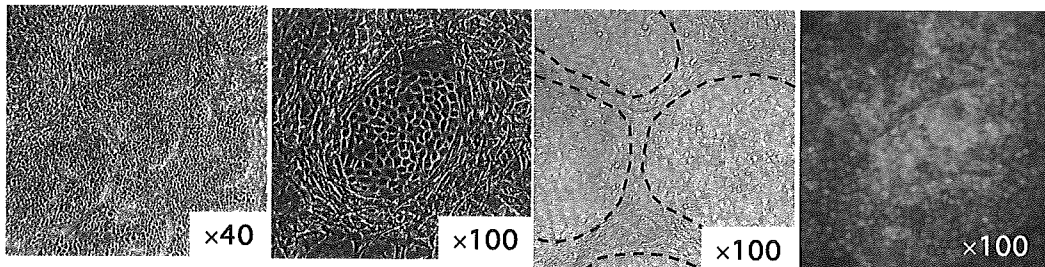
胎児肝臓に含まれる細胞は発生が進むにつれて急激に性質を変える。胎生14.5日肝臓は造血が最も活発におこる時期であり、造血幹細胞の総数も最大である。フローサイトメトリー法 (FCM) により、この時期の肝臓に含まれる細胞からPCLP1^{high}細胞を分離して、その性状を解析した。

図3 : PCLP1^{high}細胞の性状解析

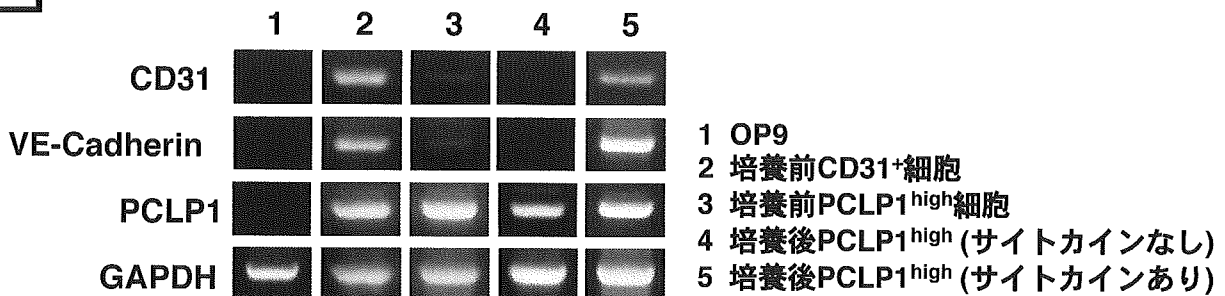


GFPトランスジェニックマウスからPCLP1^{high}細胞を分離し、OP9共培養系での増殖性を観察し(1)、各種サイトカイン存在下での遺伝子発現の変化をRT-PCR法により検討した(2)。さらに*in vivo*での分化能を検討するため、GFP+PCLP1^{high}細胞を直接(3)、またはOP9共培養後に(4)マウス新生児肝臓へ移植し8~20週後に臓器を取り出し免疫組織化学法でドナー由来細胞の性状を解析した。

1 OP9共培養でのPCLP1強陽性細胞由来コロニー



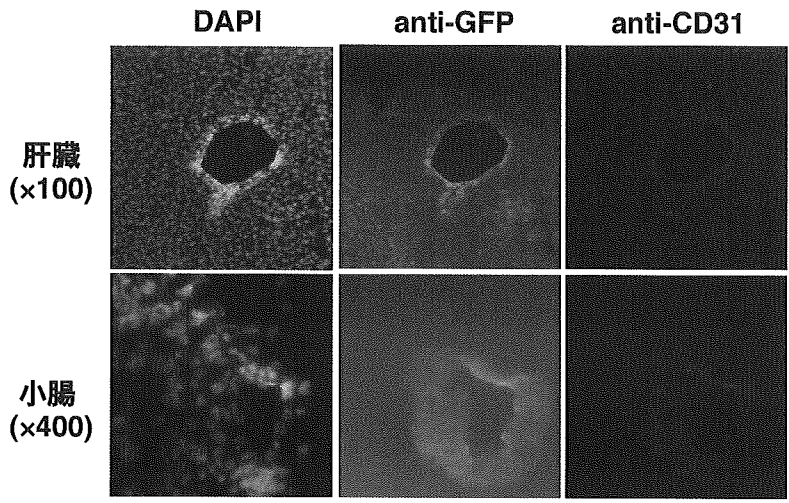
2 OP9共培養でのPCLP1^{high}細胞の増殖



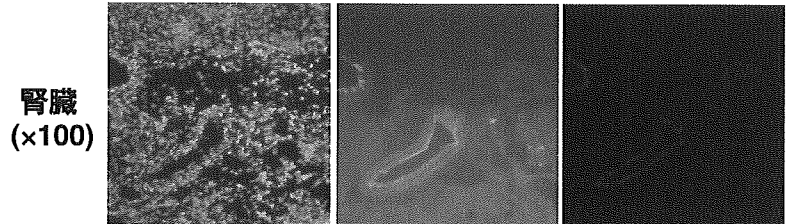
(1) GFP+PCLP1^{high}細胞をOP9ストローマ細胞と共培養したところ、内皮細胞様の形態のコロニーを形成し、高い増殖性を示した。コロニーの形態は、各種サイトカインの添加により変化を認めなかった。

(2) RT-PCR法により遺伝子発現を検討したところ、胎児肝臓から精製したPCLP1^{high}細胞は内皮細胞に発現しているCD31とVE-Cadherinを発現していなかった。OP9共培養により、サイトカインの組み合わせに応じてこれらの内皮関連遺伝子の発現が誘導された。

3 PCLP1^{high}細胞を直接移植



4 OP9共培養後のPCLP1^{high}細胞を移植



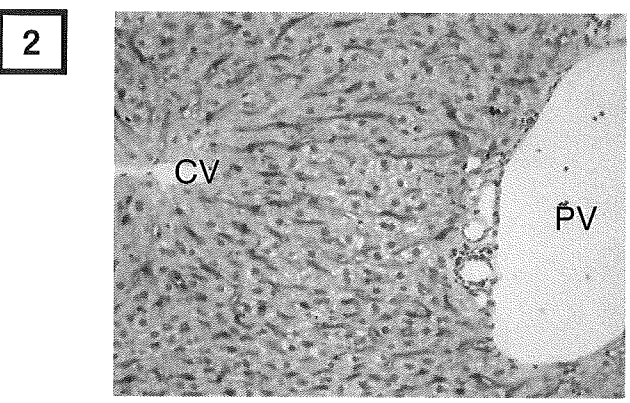
GFPトランスジェニックマウスからPCLP1^{high}細胞を精製してマウス新生児肝臓へ移植し、8-20週後に免疫組織化学法により各臓器を検討した。胎児肝臓から精製したPCLP1^{high}細胞を直接移植した場合(3)のみならず、OP9共培養後に移植した場合(4)においても、移植細胞由来の細胞が形態的に血管内皮でCD31⁺細胞として観察された。このことから、胎児肝臓PCLP1^{high}細胞は*in vivo*でも高い増殖性を持ち、その増殖性はOP9共培養で失われない事が示唆された。

図4 : Stabilin-2(Stab2)



2560 aa, ~280 k MW

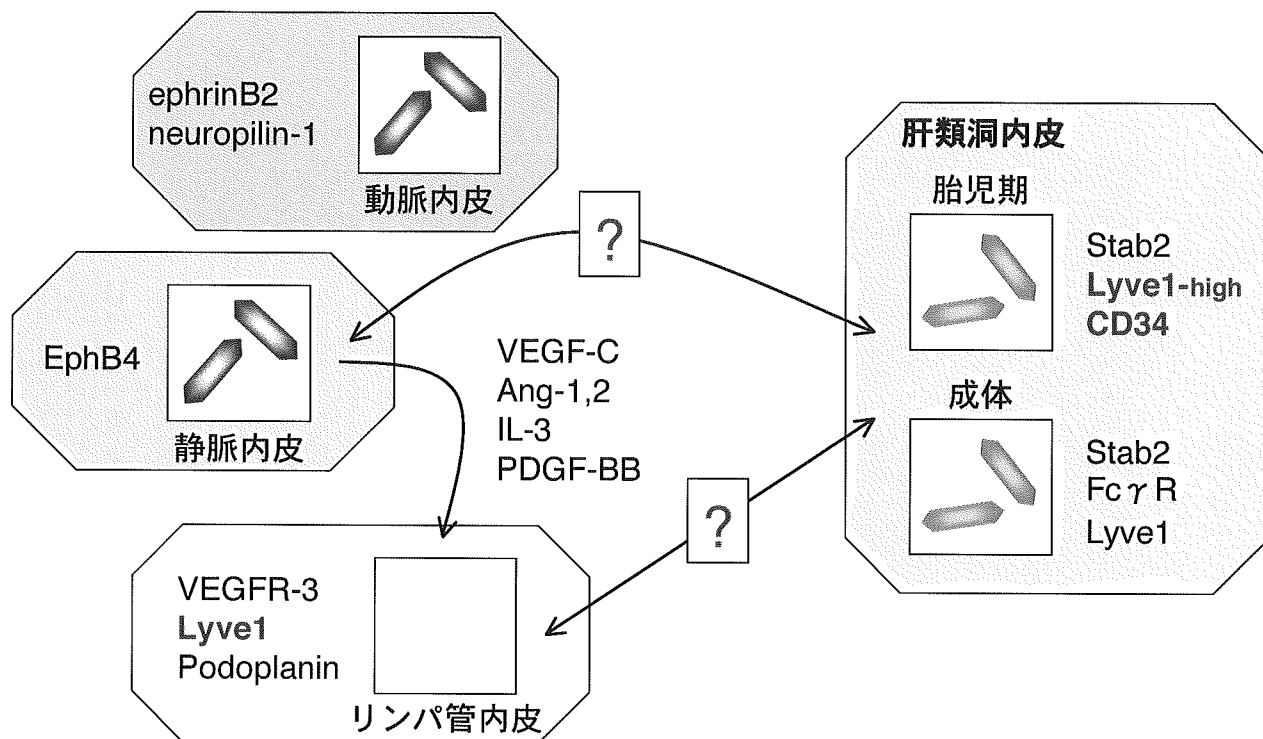
■	Signal peptide
⬡ Cys	Cysteine-rich region
○ F	Fascilin domain
◇ X	X-link domain
□	Transmembrane region



(1)Stab2のドメイン構造

(2) 成体マウス肝臓におけるStab2の発現。Stab2の発現は類洞領域においてのみ認められ門脈 (PV) や中心静脈 (CV) には検出されない。茶 : Stab2の発現, 紫 : ヘマトキシリンによる核の対比染色。

図5：血管内皮細胞の多様性



動脈・静脈・リンパ管・肝類洞内皮細胞は細胞表面抗原の発現により分離・識別が可能である。リンパ管内皮細胞と肝類洞内皮細胞は、共にリンパ管内皮細胞のマーカーであるLyve-1を発現するが、Podoplaninの発現により区別することが可能である。

II.研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者 宮島 篤 東京大学分子細胞生物学研究所・教授

書籍 なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Iwatsuki K., Tanaka K., Kaneko T., Kazama R., Okamoto S., Nakayama Y., Ito Y., Satake M., Takahashi S., Miyajima A., Watanabe T., and Hara T.	Runx1 promotes angiogenesis by down-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3.	<i>Oncogene</i>	23	1129-1137	2005
Bando T., Sekine K., Kobayashi S., Watanabe A., Rump A., Tanaka M., Suda Y., Kato S., Manabe T., and Miyajima A.	Neuronal leucine-rich repeat protein 4 is required for hippocampus-dependent long-lasting memory.	<i>Mol. Cell. Biol.</i>	25	4166	2005
Okaya A., Kitanaka J., Kitanaka N., Satake M., Kim Y., Terada K., Sugiyama T., Takemura M., Fujimoto J., Terada N., Miyajima A., and Tsujimura T.	Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes.	<i>Am. J. Pathology</i>	166	709-719	2005
Kato Y., Iwama A., Tadokoro Y., Shimoda K., Minoguchi M., Akira S., Tanaka M., Miyajima A., Kitamura T., and Nakauchi H.	Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis.	<i>J. Exp. Med.</i>	202	169-179	2005
Doyonnas R., Nielsen J.S., Chelliah S., Drew E., Hara T., Miyajima A., and McNagny K.M.	Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells.	<i>Blood</i>	105	4170-4187	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Inukai T., Inaba T., Dang J., Kuribara R., Ozawa K., Miyajima A., Wu W., Look A.T., Arinobu Y., Iwasaki H., Akashi K., Kagami K., Goi K., Sugita K., and Nakazawa S.	TEF, an antiapoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by down-regulating expression of the common chain of cytokine receptors.	<i>Blood</i>	105	4437-4444	2005
Kojima N., Shiojiri N., Sakai Y., and Miyajima A.	Expression of neuritin during liver maturation and regeneration.	<i>FEBS Letters</i>	579	4562-4566	2005
Noguchi T., Fujimoto H., Sano H., Miyajima A., Miyachi H, and Hashimoto Y.	Angiogenesis inhibitors derived from Thalidomide.	<i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>	15	5509-5513	2005
Ito T., Arimatsu N., Takeuchi M., Kawamura N., Nagata M., Saso K., Akimitsu N., Hashimoto H., Natori S., Miyajima A. and Sekimizu K.	Transcription elongation factor SII is required for definitive hematopoiesis.	<i>Mol. Cell. Biol.</i>			in press
Takeuchi M. and Miyajima A.	Hematopoiesis in Fetal Liver.	<i>Pluripotent Hematopoietic Stem Cells</i> (Ed. J. Keller) ISBN: 1-58706-182-1			2005
鬼塚和泉、竹内眞樹、宮島篤	哺乳類の胚発生における造血と成体型造血幹細胞の起源	別冊・医学の歩み 血液疾患 -State of arts	Ver.3	6-8	2005
竹内眞樹、宮島篤	肝臓における造血ニッチ －胎生期造血－	分子細胞治療	Vol.5 no.2	11-17	2006

III 研究成果の刊行物・別刷

Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells

Regis Doyonnas, Julie S. Nielsen, Shirley Chelliah, Erin Drew, Takahiko Hara, Atsushi Miyajima, and Kelly M. McNagny

Podocalyxin/podocalyxin-like protein 1 [PCLP1]/thrombomucin/MEP21 is a CD34-related sialomucin. We have performed a detailed analysis of its expression during murine development and assessed its utility as a marker of hematopoietic stem cells (HSCs) and their more differentiated progeny. We find that podocalyxin is highly expressed by the first primitive hematopoietic progenitors and nucleated red blood cells to form in the embryonic yolk sac. Likewise, podocalyxin is expressed by definitive multilineage hema-

topoietic progenitors and erythroid precursors in fetal liver. The level of podocalyxin expression gradually declines with further embryo maturation and reaches near-background levels at birth. This is followed by a postnatal burst of expression that correlates with the seeding of new hematopoietic progenitors to the spleen and bone marrow. Shortly thereafter, podocalyxin expression gradually declines, and by 4 weeks postpartum it is restricted to a rare population of Sca-1⁺, c-kit⁺, lineage marker⁻ (Lin⁻) cells in the

bone marrow. These rare podocalyxin-expressing cells are capable of serially reconstituting myeloid and lymphoid lineages in lethally irradiated recipients, suggesting they have HSC activity. In summary, we find that podocalyxin is a marker of embryonic HSCs and erythroid cells and of adult HSCs and that it may be a valuable marker for the purification of these cells for transplantation. (Blood. 2005;105:4170-4178)

© 2005 by The American Society of Hematology

Introduction

The first circulating blood cells to form during vertebrate ontogeny are large, nucleated, primitive red cells produced in the blood islands of the yolk sac (YS). These cells are essential for the survival and rapid growth of the embryo, and in mice they emerge at 7.5 to 8.5 days postcoitum (dpc) (reviewed by Palis and Yoder¹ and Keller et al²). Shortly thereafter, primitive YS hematopoietic precursors enter the newly formed vasculature and continue to divide and differentiate within the bloodstream until 13 dpc (E13),³ when they migrate through endothelial layers and enter new intraembryonic hematopoietic tissues.⁴ Subsequently, primitive YS precursors gradually disappear and are supplanted by definitive hematopoietic cells derived from the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros (AGM).⁵ Soon after they appear, definitive hematopoietic precursors migrate across endothelial barriers and seed the fetal liver (FTL), which then becomes the major site of fetal hematopoiesis. Hematopoietic activity then shifts transiently to the fetal spleen (SPL) before becoming firmly established within the bone marrow (BM) just prior to and after birth.⁶ The cellular and molecular mechanisms that govern the shift of hematopoiesis to distinct anatomic sites during development are poorly understood.

Podocalyxin (also called podocalyxin-like protein 1 [PCLP1], Myb-Ets progenitor antigen 21 [MEP21], and thrombomucin) was first defined immunologically as a heavily sialylated and sulfated

membrane protein expressed on the apical surface of glomerular epithelial cells, or podocytes, in kidney.^{7,8} Subsequently, podocalyxin was also detected on vascular endothelia, mesothelial cells lining the coelomic cavity, hemangioblasts, early hematopoietic progenitors, and platelets.⁹⁻¹⁵ Podocalyxin belongs to a large family of cell surface sialomucins and is most closely related to 2 other molecules: CD34 and endoglycan.^{13,16-19} All 3 molecules exhibit a strikingly similar genomic organization and pattern of alternative splicing, and they each encode proteins with similar biochemical motifs, suggesting they are derived from a common ancestral gene.^{13,17}

Although their function remains enigmatic, recent experiments suggest that the CD34 family of sialomucins can play a role in blocking adhesion. For example, overexpression of podocalyxin in Chinese hamster ovary (CHO) or Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells has been shown to block homotypic cell aggregation and the formation of cell-cell junctions.²⁰ Similarly, we have recently shown that podocalyxin is up-regulated on the most highly invasive human breast cancers and that it is capable of disrupting cell polarity and junction formation in these cells.¹⁹ Conversely, we have shown that disruption of the podocalyxin-encoding gene in mice leads to perinatal lethality due to profound defects in kidney and gut formation that are consistent with excessive cell-cell

From The Biomedical Research Centre, University of British Columbia, Vancouver, Canada; Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Japan; and The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, Japan.

Submitted October 22, 2004; accepted January 25, 2005. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, February 8, 2005; DOI 10.1182/blood-2004-10-4077.

Supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant MT-15477 (K.M.M.), a Grant-in Aid from the Heart and Stroke Foundation of B.C. & Yukon, a fellowship from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (J.S.N.), the Michael Smith Foundation for Health Research (E.D.), and the Heart and Stroke Foundation of B.C. & Yukon (E.D.). K.M.M. is a

Scholar of the Canadian Institutes of Health Research and the Michael Smith Foundation for Health Research.

R.D. and J.S.N. contributed equally to this study.

Reprints: Kelly M. McNagny, The Biomedical Research Centre, University of British Columbia, 2222 Health Sciences Mall, Vancouver, Canada V6T 1Z3; e-mail: kelly@brc.ubc.ca.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2005 by The American Society of Hematology