

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591387

研究課題名(和文) AnamorsinとPicotの結合阻害を標的とした新規抗腫瘍剤の開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-tumor drugs inhibiting Anamorsin and Picot binding

研究代表者

齊藤 則充 (SAITOH, Norimitsu)

大阪大学・大学院医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：30597399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：Anamorsin(AM)は、B細胞性リンパ腫の約30%で過剰発現している。本研究では、AMトランスジェニック(Tg)マウスを用い、AMの作用を解析した。Bリンパ球をLPSで刺激したところ、AM Tg Bリンパ球の増殖は、WTと比較し減弱していた。また、LPS刺激後のERK1/2およびIκBαのリン酸化が低下していた。DNAマイクロアレイをおこない、LPS刺激によって変化する遺伝子群から、その上流のシグナルを解析したところ、Rasの活性が低下していることが判明した。本研究によって、AMの作用点がRasであることが明らかとなり、過剰発現しているAMはRasを抑制することが判明した。

研究成果の概要(英文)：Anamorsin (AM) was originally isolated as a molecule that conferred resistance to apoptosis. AM deficient mice die during late gestation; AM is indispensable for embryo growth and hematopoiesis. Furthermore, our previous study showed AM overexpression in approximately 30% of B cell neoplasm cases. In this work, we focused on B cells of AM transgenic (Tg) mice. LPS-stimulated proliferation of AM Tg B cells was decreased compared with WT mice. Phosphorylation of Erk1/2 and IκBα in LPS-stimulated AM Tg B cells was also decreased. Upstream analysis based on the results of DNA micro array comparing AM Tg and WT B cells stimulated with or without LPS suggested that Ras activation was decreased in LPS-stimulated AM Tg B cells. We also confirmed impairment of LPS induced Ras activation in AM Tg mice by Ras assay. Our findings indicate the possibility that AM plays a role of negative regulation in LPS signaling pathway through the inhibition of Ras activation, which is a novel function of AM.

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：Anamorsin Picot 鉄硫黄クラスター 細胞内シグナル伝達 Ras Bリンパ球 LPS B細胞性リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

我々がクローニングした抗アポトーシス分子 Anamorsin は、細胞株を用いた *in vitro* の実験系において、サイトカイン除去により誘導されるアポトーシスに抵抗性を示した (Shibayama ら、J Exp Med, 2004)。また、gene targeting 法を用いて作製した Anamorsin 遺伝子欠損 (AMKO) マウスは、コントロールの正常マウスと比較し身体が小さく、胎生後期に致死となる。胎児肝における造血細胞が分化・増殖障害とアポトーシスの亢進をきたすことで著明な貧血をきたすという表現型を認め、Anamorsin は *in vivo* において、特に胎児肝での二次造血に必須の抗アポトーシス分子であることを明らかにした (Shibayama ら、J Exp Med, 2004)。

Anamorsin の作用機序を解明するために、Yeast-two-hybrid 法を用い、Anamorsin と結合する分子のクローニングを行った。その結果、Picot (thioredoxin-like 2) という分子が優位にクローニングされてきた。Picot は protein kinase C (PKC) と結合する分子として発見され、PKC の機能を抑制すると報告されており、Anamorsin も Picot とともに PKC およびその下流のシグナル伝達分子の活性を制御している可能性が示唆された。

Anamorsin 分子と疾患との関わりについては、我々が作製した抗 Anamorsin 抗体を用い、約 800 例の悪性リンパ腫症例の腫瘍病変の免疫組織化学染色を施行したところ、びまん性大細胞 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL)、濾胞性リンパ腫の組織型において、約 30% の症例が Anamorsin の強発現を認めた。さらに、Anamorsin の発現と臨床データとの比較をおこなったところ、DLBCL の一部の症例において、Anamorsin を強発現している場合、化学療法に対する反応性が悪くなり、生命予後が不良となることが明かとなった (Shizusawa ら、Leukemia and Lymphoma, 2008)。

以上より、Anamorsin は B 細胞性悪性リンパ腫を含む種々の腫瘍の病態形成に重要な役割をはたしている可能性があり、Anamorsin を過剰発現している腫瘍において、Anamorsin と Picot の結合を阻害することで、Anamorsin の活性を抑制し、腫瘍の増殖を抑制できる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

Anamorsin トランスジェニック (Tg) マウスを用いて、Anamorsin を過剰発現している B リンパ球の増殖能の評価をおこなう。LPS は B リンパ球の増殖因子であるため、*in vitro* および *in vivo* において、LPS による刺激をおこなった際の B リンパ球の増殖能を調べる。また、その際のシグナル伝達分子の活性状態について評価をおこない、Anamorsin の作用点を明らかにする。

また、Anamorsin と Picot の結合を阻害することで、その下流のシグナル伝達を抑制す

ることが可能かどうか検討し、さらには、その結合阻害剤 (ペプチドなど) が、Anamorsin を過剰発現する細胞において、Anamorsin の機能を抑制するかどうか検討する。

3. 研究の方法

(1) Anamorsin Tg マウスの脾臓から得た B リンパ球を *in vitro* において LPS 刺激をおこない、細胞の増殖能の検討をおこなう。また、*in vivo* においても Anamorsin Tg マウスおよび WT マウスの腹腔内に LPS を投与し、B リンパ球数の変化や、炎症反応 (免疫反応) について評価をおこなう。

(2) Anamorsin Tg マウスの脾臓から得た B リンパ球を *in vitro* において LPS 刺激をおこない、その際の LPS 刺激に關与するシグナル伝達分子の活性化について、ウェスタンブロットをおこない、リン酸化の有無によって評価する。

(3) Anamorsin Tg マウスの脾臓から得た B リンパ球と WT マウスの B リンパ球を *in vitro* において LPS 刺激をおこない、それらの細胞から mRNA を抽出し DNA マイクロアレイにより、種々の遺伝子の発現変化について、網羅的に解析をおこなう。Anamorsin Tg マウスと WT マウスの比較をおこない、差を認めた遺伝子群から、上流シグナル解析をおこない、Anamorsin の作用点について検討する。

4. 研究成果

(1) Anamorsin Tg マウスの脾臓から単離した B リンパ球を *in vitro* で LPS 刺激をおこない、その増殖能をみたところ、WT マウスの B リンパ球と比較し、予想に反して、減弱していることが判明した。また、*in vivo* でマウスの腹腔内に LPS を投与したときの脾臓の B リンパ球数の増加や、B リンパ球からの IL-1 の産生などの免疫反応について調べたところ、*in vitro* と同様に、LPS への反応性は、Anamorsin Tg マウスで、WT マウスと比較して低下していた。

(2) LPS で B リンパ球を刺激した際のシグナル伝達分子の活性を、ウェスタンブロット法を用いて評価したところ、以前、Anamorsin 欠損マウスの細胞において、変化がみられた PKC (Protein Kinase C) や p38MAPK のリン酸化については、WT マウスの B リンパ球と差を認めなかったが、ERK1/2 および I κ B のリン酸化は、Anamorsin Tg マウスの B リンパ球において低下していた。

(3) Anamorsin の作用点を明らかにする目的で Anamorsin Tg マウスと WT マウスから単離した B リンパ球を *in vitro* で LPS にて刺激した細胞から mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイをおこない、LPS 刺激によって変化する遺伝子の中で、Anamorsin Tg マウスと WT マウスで差を認める遺伝子群から、その上流のシグナルを解析したところ、Anamorsin Tg マウスの B リンパ球において Ras の活性が低下していることが判明した。

以上の結果から、Anamorsin の作用点が Ras であることが初めて明らかとなった。また、過剰発現している Anamorsin は Ras の活性を抑制することが判明した。

本研究課題の当初の目的であった Anamorsin と Picot の結合阻害による細胞増殖の抑制についての検討に関しては、Anamorsin を過剰発現することで、Ras およびその下流のシグナル伝達が抑制されることが明らかとなったことで、今後は、Anamorsin-Picot の結合阻害以外に、Anamorsin 分子そのものの過剰発現を分子標的薬の創薬に結びつけていける可能性が見出された。

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 8 件)

Satoh Y, Yokota T, Oritani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y et al. 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)

Togi S, Shiga K, Kon S, Oritani K, Matsuda T. Y14 positively regulates TNF- α -induced NF- κ B transcriptional activity via interacting RIP1 and TRADD beyond an exon junction complex protein. *J Immunol* 191: 1436-1444, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1300501 (査読有)

Muromoto R, Oritani K, Matsuda T. Jun activation domain-binding protein 1 (JAB1) is required for the optimal response to interferons. *J Biol Chem* 288:30969-30979, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M113.485847 (査読有)

Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Shibata M, Mizuki M, Kanakura Y et al. C-terminal mutation of RUNX1 attenuates the DNA-damage repair response in hematopoietic stem cells. *Leukemia* 26: 303-311, 2012. DOI: 10.1038/leu.2011.202. (査読有)

Sudo T, Yokota T, Oritani K, Shibayama H, Ezo S, Kanakura Y et al. The endothelial antigen ESAM monitors hematopoietic stem cell status between quiescence and self-renewal. *J Immunol* 189: 200-210, 2012. DOI: 10.4049/jimmunol.1200056. (査読有)

Sekine Y, Ikeda O, Kanakura Y, Oritani K, Matsuda T et al. STAP-2 interacts with and modulates BCR-ABL-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 31:4384-4396, 2012. DOI: 10.1038/onc.2011.604. (査

読有)

Saitoh N, Oritani K, Saito K, Yokota T, Kanakura Y et al. Identification of functional domains and novel binding partners of STIM proteins. *J Cell Biochem* 112: 147-156, 2011. DOI: 10.1002/jcb.22910. (査読有)

Saito Y, Shibayama H, Tanaka H, Tanimura A, Matsumura I, Kanakura Y. PICOT is a molecule which binds to anamorsin. *Biochem Biophys Res Commun* 408: 329-333, 2011. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.04.033. (査読有)

[学会発表](計 10 件)

石橋知彦, 横田貴史, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓ほか (口演) MS4A3 発現はヒト造血における早期骨髓球系分化の指標となる 第 75 回日本血液学会学術集会 (2013.10.12, 北海道)

Ishibashi T, Saitoh N, Ezo S, Shibayama H, Kincade PW, Oritani K, Kanakura Y et al (Poster) Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Marks Human Hematopoietic Stem Cells Regardless Of The HSC Sources The American Society of Hematology 55th Annual Meeting (2013.12.8, New Orleans, LA, USA)

Fujita N, Oritani K, Ichii M, Matsuda T, Kanakura Y (口演) Signal transducing adaptor protein -2 enhances intestinal inflammation via altering gene expression in epithelial cells 第 42 回日本免疫学会学術集会 (2013.12.11, 千葉)

Fujita N, Oritani K, Yokota T, Saito N, Sudo T, Yamawaki K, Kanakura Y (Poster) Identification of osteoblast stimulating factor-5 as a novel regulator of early lymphocyte development The 17th Congress of the European Hematology Association (2012.6.15, Amsterdam, Netherlands)

Ishibashi T, Yokota T, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y et al (一般口演) Significance of novel HSC marker ESAM expression in cord blood 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012.10.19, 京都)

Tanimura A, Hamanaka Y, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Shibayama H, Kanakura Y et al (ポスター) An anti-apoptotic molecule, Anamorsin, functions in both Fe/S cluster assembly and iron homeostasis 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012.10.20, 京

都)

Sudo T, Yokota T, Oritani K, Shibayama H, Kanakura Y et al (一般口演) Role of endothelial antigen ESAM in hematopoietic stem cells status 第74回日本血液学会学術集会 (2012.10.20, 京都)

Tanimura A, Hamanaka Y, Saitoh N, Oritani K, Shibayama H, Kanakura Y et al (Oral) An anti-apoptotic molecule, Anamorsin, is essential for erythropoiesis through the regulation of cellular labile iron pool The American Society of Hematology 54th Annual Meeting (2012.12.10, Atlanta, USA)

西 薫 悠, 齊藤則充, 織谷健司, 金倉讓ほか (口演) 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)

福島健太郎, 前田哲生, 齊藤則充, 藤田二郎, 織谷健司, 金倉讓ほか (口演) 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, 愛知)

[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

齊藤則充 (SAITOH, Norimitsu)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教

(常勤)

研究者番号：30597399

(2)研究分担者

柴山浩彦 (SHIBAYAMA Hirohiko)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60346202

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

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

(3)連携研究者

無