

平成 21 年 4 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591108
 研究課題名 (和文) 抗アポトーシス分子アナモルシンの作用機序と悪性リンパ腫における役割の解明
 研究課題名 (英文) Clarification of functions of Anamorsin, anti-apoptotic molecule, and its roles in malignant lymphomas
 研究代表者
 柴山 浩彦 (SHIBAYAMA HIROHIKO)
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：60346202

研究成果の概要：アナモルシン (AM) は我々の研究室で同定した細胞死に抵抗性を示す新規分子である。本研究では、悪性リンパ腫、特に DLBCL における発現を免疫染色法にて調べ、臨床データと比較することにより、AM 発現の意義を検討した。結果、AM が一部の悪性リンパ腫において強く発現していることと、Low IPI あるいは Non-GCB type の DLBCL 症例、特に Rx 治療を行っていない場合に、生物学的予後不良因子となりうる事が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000円	570,000円	2,470,000円
2008年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

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：アナモルシン、悪性リンパ腫、遺伝子改変マウス、Bリンパ球、Picot

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アナモルシンは、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、さらに VP-16、staurosporine、 γ -irradiation などのアポトーシス誘導刺激に対しても抵抗性を示す機能を有していた。

また、gene targeting 法を用いて作製したアナモルシン遺伝子欠損マウスは、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。また、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、アナモルシンは *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。

アナモルシン分子の遺伝子配列あるいはアミノ酸配列を用いた相同性の検索あるいはモチーフ検索を行ったところ、アナモルシン分子は、既知の抗アポトーシス分子である Bcl-2 ファミリー分子、あるいは IAP ファミリー分子とは相同性を示さない全く新規の分子であることが判明した。また、上記のモチーフ検索により、アナモルシンはメチルトランスフェラーゼ (MT) モチーフを有しており、MT モチーフ部分を欠損した変異アナモルシンは抗アポトーシス活性

を示さず、MT阻害剤がアナモルシンの抗アポトーシス活性を阻害したことよりアナモルシンはMTとして機能している可能性が示唆されたが、アナモルシンの作用機序に関する詳細はいまだ不明である。

アナモルシンは、種々のサイトカイン刺激により、その発現が誘導され、また抗アナモルシン抗体を用いての細胞の免疫染色の結果、アナモルシンは細胞質に局在することがわかっている。一般的にサイトカインのシグナル伝達においては、複数の分子がリン酸化、アセチル化、メチル化などを介して、連続してそのシグナルを核内に伝えることが知られている。アナモルシンもサイトカインによる抗アポトーシスシグナルを伝える一連の分子群の一翼を担っている可能性、あるいはそれらの分子の機能をメチル化により修飾する可能性などが考えられる。そこで、我々はアナモルシンの作用機序を解明するために、Yeast-two-hybrid法を用い、アナモルシン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 θ (PKC θ) と結合する分子として発見され、PKC θ の機能を抑制する可能性が示唆されている。しかし、Picotの造血細胞の分化・増殖・アポトーシスにおける役割は明らかにされていない。

さらに、我々は、約200例の造血器腫瘍細胞および約10種類の血液細胞株でのアナモルシンの発現について、Real time PCR法を用い、アナモルシンmRNA発現のスクリーニングを行ったところ、アナモルシンを高発現している例（解析した症例検体の中では、正常骨髄細胞の発現量に比し、2倍から10倍量発現している症例が約16%、10倍以上量発現している症例が約17%）を認めた。アナモルシンが抗アポトーシス作用を有することから、アナモルシンを高発現している造血器腫瘍細胞では、アナモルシンがその細胞の腫瘍化に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。次に、我々が作製した抗アナモルシン抗体を用い、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、濾胞性リンパ腫の組織型において、約30%の症例がアナモルシンの高発現を認めた。また、in vivoにおけるアナモルシンの造腫瘍性を検討する目的にてアナモルシン トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、その表現型を解析したところ、Tgマウスの脾臓において、白脾髄の拡

大とB細胞の割合の増加を認めた。このことから、一部のB細胞性リンパ腫の発生には、アナモルシンの高発現が関与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

(1) 悪性リンパ腫症例におけるアナモルシン高発現の意義の解析

アナモルシンを高発現している悪性リンパ腫症例の臨床的特徴を明らかとするため、免疫組織染色を施行したびまん性大細胞B細胞性リンパ腫の全症例の臨床経過、治療反応性、予後因子などの臨床データを集め、アナモルシンの発現強度との相関性の有無を検討する。

(2) アナモルシントランスジェニックマウスの解析

我々が作製したアナモルシン Tg マウスは、外見上、異常を認めず、また、肉眼的な臓器の異常を認めない。2年以上の観察の結果、腫瘍の自然発生もみられなかった。しかし、組織の詳細な検討をおこなったところ、脾臓において、白脾髄の拡大を認め、フローサイトメトリーによりBリンパ球の割合の増加を認めた。本研究では、アナモルシン Tg マウスの脾臓から得たBリンパ球の増殖能や各種アポトーシス刺激に対する抵抗性を明らかにする。また、その細胞におけるシグナル伝達分子の変化や cell cycle 関連分子やアポトーシス関連分子の変化についても検討する。

(3) アナモルシンとPicotの相互作用の解析

我々は、すでにPicotに対する単クローン抗体 (2つのエピトープに対する抗体) の作製まで成功しており、今後は、本抗体を用いた蛋白レベルでのアナモルシンとPicotとの相互作用について検討をおこなう。PicotがPKC θ と結合することは以前に報告されているが、PKC θ のキナーゼ活性を直接的に制御しているかどうかは明らかにされておらず、さらに造血細胞内でのPicotとPKC θ の相互作用や細胞の増殖・分化・アポトーシスに対する影響も解析されていない。Picot、PKC θ のin vitro、in vivoでの相互作用の検討および、これらの分子とアナモルシンの関係について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アナモルシン高発現悪性リンパ腫の臨床的検討

約800例の悪性リンパ腫症例のアナモルシン発現について抗アナモルシン抗体を用いた免疫組織化学染色法により検討したと

ころ、アナモルシン高発現を認める割合が最も高かったのは、びまん性大細胞B細胞性リンパ腫(DLBCL)と濾胞性リンパ腫の2組織型であった。検討した悪性リンパ腫症例のうち、特にDLBCLについて、その臨床データ(臨床経過、治療反応性、予後因子など)を集積し、アナモルシン発現レベルとの相関関係について統計学的に調べる。

(2) アナモルシントランスジェニックマウスの解析

我々は、CAGプロモーター下流にマウスアナモルシンcDNA全長を組み込んだベクターをマウスの受精卵に打ち込み、全身の細胞にアナモルシンを高発現させたアナモルシントランスジェニック(Tg)マウスの作製を行った。作製したアナモルシンTgマウスにおいて、種々の臓器のアナモルシンの発現を、免疫組織化学染色法およびウェスタンブロットティング法にて、確認したところ、検索したすべての臓器において、アナモルシン蛋白の高発現を認めた。Tgマウスの臓器は、肉眼的な異常は認めなかったが、組織を詳細に検討したところ、脾臓の白脾髄の拡大を認め、フローサイトメトリーでは、Bリンパ球の割合の増加を認めた。このことから、Bリンパ球において、アナモルシンを過剰発現させると、増殖・抗アポトーシスの作用を示す可能性が示された。TgマウスのBリンパ球を単離し、増殖能や各種アポトーシス刺激に対する抵抗性を明らかにする。またその細胞におけるcell cycle関連分子やアポトーシス関連分子の変化についても検討する。

また、現在までに、CAG-アナモルシンTgマウスとp53 KOマウスを交配し、アナモルシンTg/p53 KOマウスを4匹作製したところ、そのうち、3匹において、脾臓の腫大を認めた。また、組織では脾臓の正常構造の破壊と巨大細胞の出現を認めている。アナモルシンTgマウスの脾臓において、Bリンパ球の増加がみられることより、その細胞にp53の欠失が加わることで、Bリンパ球が腫瘍化をきたしている可能性が考えられた。アナモルシンTg/p53 KOマウスを増やし、そのマウスの脾臓の解析を行う。

(3) アナモルシンと結合する分子 Picotの解析

アナモルシンと結合する分子をYeast-two-hybrid法を用いクローニングを行ったところ、Picot(thioredoxin-like 2)という分子がクローニングされた。PicotはPKC θ と結合し、PKC θ の機能を調節する分子として発見された。また、これまでの報告では、PicotもPKC θ も造血細胞での発現が報告されてい

る。しかし、造血細胞の増殖・分化・アポトーシスに対する役割は解明されておらず、さらに、アナモルシンとこれらの分子の相互作用については、全く検討されていない。そこで、最初に、アナモルシンとPicotの結合に関して、それぞれのdeletion mutantを作製し、結合に必須の部位をYeast-two-hybrid法やGST pull down アッセイなどを用い、明らかにする。次に、アナモルシンとの結合部位を欠いたPicotをBa/F3細胞などの造血細胞株に強制発現させ、細胞の増殖・アポトーシスに影響があるかどうかを調べる。また、我々はすでにPicotに対する抗体を作製しているので、これらの抗体を用いて、アナモルシンKO細胞やアナモルシンTg細胞におけるPicotの発現変化について調べる。また、RNAiやanti-sense oligo DNAなどにより、Picotの発現を低下させ、そのときの細胞の増殖・アポトーシスへの影響、アナモルシンの発現変化を検討する。

4. 研究成果

(1) 悪性リンパ腫症例におけるアナモルシン高発現の意義の解析

対象は大阪リンパ腫研究会に登録されたDLBCL患者234症例とした。全症例をAMの発現強度にもとづき、全生存率(OS)をみたところ、AMの強発現群(89例)と陰性又は弱発現群(145例)との間に有意な差を認めなかったが、Rituximab(Rx)による治療の有無で2群に分けOSを検討すると、Rxによる治療を行っていない群においてAMを強く発現している症例は有意に生命予後が不良であった。また、国際予後指標(IPI)ごとに分けて検討すると、Low IPI群において、AM強発現症例の生命予後が有意に不良であった。また、他の生物学的マーカーであるGCB type or Non-GCB typeに分けた場合もNon-GCB typeにおいて、AM強発現症例の生命予後が有意に不良であった。この研究結果から、AMが一部の悪性リンパ腫において強く発現していることと、Low IPIあるいはNon-GCB typeのDLBCL症例、特にRx治療を行っていない場合に、生物学的予後不良因子となりうる事が明らかとなった。

(2) アナモルシントランスジェニックマウスの解析

AM Tgマウスの脾臓からBリンパ球を純化し、AM高発現Bリンパ球の増殖能について検討した。AM Tgマウスは、生後2年経過しても、野生型(WT)マウスと比較し、腫瘍の発生率の増加はみられなかった。また、AM Tg

マウスの脾臓のサイズは WT マウスと比較して差はみられなかったが、脾臓内の B リンパ球の割合の増加がみられた。また、AM Tg マウスと P53 ノックアウト (KO) マウスを交配し、AM Tg-P53 KO マウスを作製したところ、高率に脾臓の増大が認められ、その脾臓から得られた細胞を培養することで、サイトカインなどの刺激因子非存在下で自然増殖する細胞株の樹立に成功した。また、AM 高発現 B リンパ球を LPS で刺激した際のシグナル伝達分子 (ERK1, 2, NF- κ B) のリン酸化を調べたところ、WT の B リンパ球と比較してこれらの分子 (特に ERK1, 2) のリン酸化の亢進がみられ、AM は細胞増殖のシグナル伝達分子の活性化に寄与していることが示された。

(3) アナモルシンと Picot の相互作用の解析

アナモルシンと Picot の deletion mutant を用いて、Yeast-two-hybrid を行い、両者の結合が、それぞれの分子のどの部位で起こっているか検討した。結果、アナモルシンの N 末側にあるメチルトランスフェラーゼモチーフを含む部位と Picot の N 末側にあるチオレドキシシンライクドメインにおいて、結合していることが明らかとなった。また、GST-Picot 融合蛋白質を用いて Pull-down assay を行い、アナモルシンと Picot の in vitro での結合を確認した。

アナモルシントランスジェニックマウスの各臓器と、アナモルシンノックアウトマウス胎児の MEF を作製し、cell lysate を作り、Picot の発現を調べた。結果、PICOT の発現量に変化は認められなかった。

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 16 件)

- ① Shizusawa T, Shibayama H, Murata S, Saitoh Y, Sugimoto Y, Matsumura I, Ogawa H, Sugiyama H, Fukuhara S, Hino M, Kanamaru A, Yamauchi A, Aozasa K, Kanakura Y. The expression of anamorsin in diffuse large B cell lymphoma: Possible prognostic biomarker for low IPI patients. *Leuk Lymphoma* 49:113-121, 2008, 査読有
- ② Matsumura I, Mizuki M, Kanakura Y. Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies. *Cancer Sci* 99:479-485, 2008, 査読有
- ③ Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Ezoe S, Fukushima K, Tokunaga M, Yasumi M, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Okuda T, Kanakura Y. AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells. *J Biol Chem* 283:30045-30056, 2008, 査読有
- ④ Isohashi K, Tatsumi M, Higuchi I, Inoue A, Nakajo K, Ishikawa J, Shimosegawa E, Kanakura Y, Nakamura H, Hatazawa J. 18 F-FDG-PET in patients with malignant lymphoma having long-term follow-up: staging and restaging, and evaluation of treatment response and recurrence. *Ann Nucl Med* 22:795-802, 2008, 査読有
- ⑤ 金倉 譲. トランスレーショナルリサーチ. *分子細胞治療* 7:93-94, 2008, 査読無
- ⑥ 柴山浩彦. 抗死分子アナモルシンとリンパ系腫瘍. *臨床血液* 49:234-239, 2008, 査読無
- ⑦ 松村 到, 金倉 譲. がん幹細胞を標的とした治療の可能性. *血液・腫瘍科* 56:120-126, 2008, 査読無
- ⑧ Mantel C, Guo Y, Lee MR, Kim MK, Han MK, Shibayama H, Fukuda S, Yoder MC, Pelus LM, Kim KS, Broxmeyer HE. Checkpoint apoptosis uncoupling in human and mouse embryonic stem cells: a source of karyotypic instability. *Blood* 109:4518-4527, 2007, 査読有
- ⑨ Yamauchi A, Fujita S, Ikeda J, Nakamichi I, Fukuhara S, Hino M, Kanakura Y, Ogawa H, Sugiyama H, Kanamaru A, Aozasa K. Diffuse large B-cell lymphoma in the young in Japan: A study by the Osaka Lymphoma Study Group. *Am J Hematol* 82:893-897, 2007, 査読有
- ⑩ Tanaka H, Matsumura I, Kanakura Y. Potential target molecules for *ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells and their roles in normal hematopoiesis. *J Stem Cells* 2:167-183, 2007, 査読有
- ⑪ Ishiko J, Mizuki M, Yasumi M, Ujiie H, Nakamichi I, Aozasa K, Kanakura Y. An indolent subtype of "intravascular lymphoma": A case with a 3-year history of LDH elevation. *Leuk Lymphoma* 48:1872-1874, 2007, 査読有
- ⑫ Nakamichi I, Tomita Y, Zhang B, Sugiyama H, Kanakura Y, Fukuhara S, Hino M, Kanamaru A, Ogawa H, Aozasa K.

Correlation between promoter hypermethylation of GSTP1 and response to chemotherapy in diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol* 86:557-564, 2007, 査読有

- ⑬ 金倉 譲. 総論：血液疾患領域の最近の進歩 -分子病態に基づく診断と治療-. *BIO Clinica* 22:296-297, 2007、査読無
- ⑭ 松村 到, 金倉 譲. 造血幹細胞を制御するシグナル伝達分子. *血液・腫瘍科* 54:635-640, 2007、査読無
- ⑮ 松村 到, 金倉 譲. 血球分化に伴う細胞周期制御とそのメカニズム. *血液フロンティア* 17:43-50, 2007、査読無
- ⑯ 松村 到, 金倉 譲. 転写因子による血液細胞の分化の制御とタンパク質間相互作用. *生体の科学* 58:460-461, 2007、査読無

[学会発表] (計 6 件)

- ① 小原尚恵, 柴山浩彦, 村田信介, 齋藤有理, 杉本夕奈, 松村 到, 青笹克之, 金倉 譲 (ポスター) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) におけるアナモルシンの発現：アナモルシンは低リスク症例において生物学的予後因子となりうる、第 105 回日本内科学会総会・講演会 (2008. 4. 11-13, 東京)
- ② Fukushima K, Matsumura I, Ezoe S, Shibayama H, Yokota T, Tanaka H, Kanakura Y (Poster) FIP1L1/PDGFR[alpha] imposes commitment towards eosinophil lineage on hematopoietic stem/progenitor cells by modifying the expression and function of lineage specific transcription factors. American Society of Hematology 49th Annual meeting (2007. 12. 8-11, Atlanta, USA)
- ③ 杉本夕奈, 柴山浩彦, 野島順三, 齋藤有里, 村田信介, 小原尚恵, 金倉 譲 (ポスター) ELISA 法による血清中アナモルシン測定系の樹立
第 54 回日本臨床検査医学会・第 47 回日本臨床化学会 (2007. 11. 22-25, 大阪)
- ④ 柴山浩彦 (シンポジウム) 抗死分子アナモルシンとリンパ系腫瘍
第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会 (2007. 10. 11-13, 横浜)
- ⑤ 福島健太郎, 松村 到, 江副幸子, 田中宏和, 柴山浩彦, 水木満佐央, 金倉 譲 (ポスター) FIP1L1/PDGFR α imposes commitment towards eosinophilic lineage

on hematopoietic stem/progenitor cells
第 66 回日本癌学会総会 (2007. 10. 3-5, 横浜)

- ⑥ 齋藤有理, 柴山浩彦, 沈沢尚恵, 村田信介, 松村 到, 青笹克之, 金倉 譲 (ポスター) Anamorsin is a prognostic biomarker for low IPI DLBCL patients
第 66 回日本癌学会総会 (2007. 10. 3-5, 横浜)

[図書] (計 3 件)

1. 松村 到, 金倉 譲. 造血器腫瘍の分子標的療法 (黒川峰夫編), 医歯薬出版株式会社, 東京, 2008, pp95-100.
2. 松村 到, 金倉 譲. 骨髓異形成症候群 (MDS) の基礎と臨床 (朝長 万左男編), 医薬ジャーナル社, 東京, 2008, pp264-273.
3. 松村 到, 金倉 譲. 内科学 第 9 版 (杉本恒明, 矢崎義雄編) 朝倉書店, 東京, 2007, pp1555-1559.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴山 浩彦 (SHIBAYAMA HIROHIKO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：6 0 3 4 6 2 0 2

(2) 研究分担者

金倉 譲 (KANAKURA YUZURU)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：2 0 1 7 7 4 8 9
松村 到 (MATSUMURA ITARU)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：0 0 2 9 4 0 8 3
水木 満佐央 (MIZUKI MASAO)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：8 0 2 8 3 7 6 1

(3) 連携研究者

なし