

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月8日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390194

研究課題名（和文） 抗アポトーシス分子アナモルシンの機能解析と造血における役割

研究課題名（英文） Analysis of functions of anamorsin, an anti-apoptotic molecule, in hematopoiesis

研究代表者 金倉 譲 (KANAKURA YUZURU)
 大阪大学・医学系研究科・教授
 研究者番号：20177489

研究成果の概要（和文）：アナモルシン（AM）欠損マウスの胎児造血幹細胞および胎児肝ストローマ細胞を用いて、AM が造血幹細胞と造血支持細胞の両方において造血に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、AM 欠損細胞において、細胞内に自由鉄が蓄積することで、ROS が蓄積し、アポトーシスの増加につながることをみだし、AM が鉄・硫黄クラスター形成に関与し、細胞内の鉄代謝を調節する作用を有していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We clarified anamorsin (AM) played important roles on definitive hematopoiesis in both of hematopoietic stem cells and fetal liver stromal cells by using AM deficient fetal liver. Furthermore, we found AM deficiency impaired the iron homeostasis through iron/sulfur protein biogenesis and resulted in the increase of labile iron pool, the accumulation of ROS and the induction of apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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、遺伝子改変マウス、造血、鉄・硫黄クラスター、ROS、アポトーシス、

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（AM）は、既知の分子と相同性を有さない。AM 欠損マウスは身体が小さく、胎児肝における二次造血が障害され、胎生後期に致死となる。また、胎児線維芽細胞の増殖が障害されている。

また、最近、AM の yeast ホモログ Dre2 が鉄・硫黄クラスター形成に必須であることが示された。

以上のことから、AM は抗アポトーシス作用、細胞増殖促進作用以外に、鉄・硫黄クラスター形成に関わる分子として、種々の細胞の機能に関わっている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1) 造血幹細胞から成熟血球が発生する過程のどの分化段階において、また、どの系統の細胞において AM が発現しているか検討する。特に、赤芽球系細胞の発生過程における AM

の発現を解析する。

(2)造血における AM の機能を解析する。

①AM 欠損造血幹細胞を用いて、造血再構築能および limiting dilution 法によって造血幹細胞の数、頻度を測定する。

②AM 欠損胎児肝ストローマ細胞の造血支持能について、野生型マウス造血幹細胞と共培養 (organ culture) することで検討する。

(3)鉄・硫黄クラスター形成における AM の機能を解析する。

(4)AM 欠損胎児線維芽細胞の細胞増殖におけるシグナル伝達分子の活性化について検討する。

3. 研究の方法

(1)野生型マウスの胎児肝あるいは成体マウスの骨髄から得た造血細胞をフローサイトメトリーを用い、表面抗原の発現パターンによって、各系統・各分化段階の細胞に純化し、それぞれの細胞から抽出した mRNA を用いて RQ-PCR によって、AM の発現量を定量する。

(2)野生型マウスおよび AM 欠損マウスの胎生 14.5 日目の胎児肝から造血幹細胞

(c-kit+sca-1+lin⁻; KSL 細胞) を純化し、メチルセルロース法によるコロニーアッセイや放射線照射を行った recipient マウスに competitor と共に移植を行い、その生着率の検討を行う。

また、野生型マウスおよび AM 欠損マウスの胎生 14.5 日目の胎児肝からストローマ細胞を単離し、そのストローマ細胞と造血幹細胞を共培養したあと、造血幹細胞のコロニー形成能を評価する。

(3)野生型マウスおよび AM 欠損マウスの胎生 14.5 日目の胎児肝からストローマ細胞を単離し、鉄・硫黄クラスター蛋白である鉄制御蛋白 1 (Iron regulatory protein; IRP1) の発現およびアコニターゼ活性を検討する。

(4)野生型マウスおよび AM 欠損マウス胎生 14.5 日目の胎児から胎児線維芽細胞 (MEF) を作成し、細胞増殖に関わる種々のシグナル伝達分子の活性化 (主にリン酸化) の状態をウェスタンブロッティングを用いて検討する。また、AM は PICOT と結合し、PICOT が PKC の活性を抑制することが知られているので、PKC の各アイソザイムのリン酸化について、TPA 刺激を行い調べる。

4. 研究成果

(1)AM は造血幹細胞から前駆細胞にかけての未分化細胞に強く発現しており、成熟とともに

に発現量が低下することが明らかとなった。その傾向は、赤芽球系細胞においても同様であった。

(2)AM 欠損造血幹細胞のコロニー形成能は、野生型と比較して著しく低下していた。また、AM 欠損造血幹細胞を competitor とともに放射線照射した野生型マウスに移植した場合に、キメラ率は低いが、生着可能であることが判明した。二次移植を行った場合も同様の結果であった。

次に、野生型造血幹細胞と AM 欠損胎児肝ストローマ細胞を共培養し、その後、コロニーアッセイを行ったところ、コロニー数が著明に低下した。また、この現象は、共培養する際に造血幹細胞とストローマ細胞の間に膜を置くとみられないことから、何らかの接着が必須であることが明らかとなった。

(3)AM KO マウスから作成した MEF 細胞や胎児肝細胞などを用いて、AM の鉄・硫黄クラスター蛋白としての機能を検討した。まず、IRP-1 の発現およびアコニターゼ活性などを調べたところ、AM KO 細胞では、IRP-1 の発現低下およびアコニターゼ活性の低下が認められ、また、AM KO 細胞に AM を発現させたところ、IRP-1 の発現およびアコニターゼ活性が回復した。さらに、AM KO 細胞での ROS の蓄積などを検討したところ、H₂O₂ の添加により、WT 細胞と比較して、AM KO 細胞では、容易に ROS が蓄積し、細胞のアポトーシス誘導が認められた。

(4)AM 欠損 MEF においては、PKC θ 、PKC δ 、p38MAPK のリン酸化の亢進がみられ、その下流で cyclinD1 の発現低下がみられることを明らかにした。PKC 阻害剤や、p38MAPK の阻害剤によって、部分的に増殖能が回復することも明らかとなった。

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 19 件)

- ① Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Harada H, Harada Y, Matsui K, Shibata M, Mizuki M, Kanakura Y. C-terminal mutation of RUNX1 attenuates the DNA-damage repair response in hematopoietic stem cells. *Leukemia* 26:303-311, 2012 査読有
- ② Matsui K, Ezoe S, Oritani K, Shibata M, Tokunaga M, Fujita N, Tanimura A, Sudo T, Tanaka H, McBurney MW, Matsumura I, Kanakura Y. NAD-dependent histone deacetylase, SIRT1, plays essential

- roles in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 418:811-817, 2012 査読有
- ③ Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain of α IIb by platelet-associated anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. *Blood* 120:1499-1509, 2012 査読有
- ④ Sudo T, Yokota T, Oritani K, Satoh Y, Sugiyama T, Ishida T, Shibayama H, Ezoe S, Fujita N, Tanaka H, Maeda T, Nagasawa T, Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM monitors hematopoietic stem cell status between quiescence and self-renewal. *J Immunol* 189:200-210, 2012 査読有
- ⑤ Yoshida A, Mizote I, Sakata Y, Maeda T, Kanakura Y, Yamauchi-Takahara K, Komuro I. Effect of vasodilators in patient with pulmonary hypertension associated with hemolytic anemia. *J Cardiol Cases* 6:e75-e77, 2012 査読有
- ⑥ Murakami Y, Inoue N, Shichishima T, Ohta R, Noji H, Maeda Y, Nishimura JI, Kanakura Y, Kinoshita T. Deregulated expression of HMGA2 is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 156:383-387, 2012 査読有
- ⑦ Kanakura Y, Ohyashiki K, Shichishima T, Okamoto S, Ando K, Ninomiya H, Kawaguchi T, Nakao S, Nakakuma H, Nishimura J, Kinoshita T, Bedrosian CL, Valentine ME, Khursigara G, Ozawa K, Omine M. Safety and efficacy of the terminal complement inhibitor eculizumab in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the AEGIS Clinical Trial. *Int J Hematol* 93:36-46, 2011 査読有
- ⑧ Tadokoro S, Nakazawa T, Kamae T, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. A potential role for α -actinin in inside-out α IIb β 3 signaling. *Blood* 117:250-258, 2011 査読有
- ⑨ Saitoh N, Oritani K, Saito K, Yokota T, Ichii M, Sudo T, Fujita N, Nakajima K, Okada M, Kanakura Y. Identification of functional domains and novel binding partners of STIM proteins. *J Cell Biochem* 112:147-156, 2011 査読有
- ⑩ Shibata M, Ezoe S, Oritani K, Matsui K, Tokunaga M, Fujita N, Saito Y, Takahashi T, Hino M, Matsumura I, Kanakura Y. Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via in vitro analysis of Bcr-Abl phosphorylation. *Leuk Res* 35:1205-1211, 2011 査読有
- ⑪ Fujita J, Mizuki M, Otsuka M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Tokunaga M, Matsumura I, Kanakura Y. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. *Immunol Lett* 136:61-73, 2011 査読有
- ⑫ Otsuka M, Mizuki M, Fujita J, Kang S, Kanakura Y. Constitutive active FGFR3 Lys650Glu mutation enhances the bortezomib-sensitivity in plasma cell malignancy. *Anticancer Res* 31:113-122, 2011 査読有
- ⑬ Saito Y, Shibayama H, Tanaka H, Tanimura A, Kanakura Y. A cell-death-defying factor, anamorsin mediates cell growth through inactivation of PKC and p38MAPK. *Biochem Biophys Res Commun* 405:303-307, 2011 査読有
- ⑭ 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 査読有
- ⑮ Kamae T, Kiyomizu K, Nakazawa T, Tadokoro S, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a heterozygous mutation in the thromboxane A_2 receptor. *J Thromb Haemost* 9:1040-1048, 2011 査読有
- ⑯ Tokunaga M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Matsui K, Shibata M, Tanimura A, Oritani K, Matsumura I, Kanakura Y. BCR-ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21^{CIP1/WAF1}. *J Biol Chem* 285:31774-31782, 2010 査読有
- ⑰ Ichii M, Oritani K, Yokota T, Schultz DC, Holter JL, Kanakura Y, Kincade PW. Stromal cell-free conditions favorable for human B lymphopoiesis in culture. *J Immunol Methods* 359:47-55,

2010 査読有

- ⑮ Ichii M, Oritani K, Yokota T, Zhang Q, Garrett KP, Kanakura Y, Kincade PW. The density of CD10 corresponds to commitment and progression in the human B lymphoid lineage. PLoS One 5:e12954, 2010 査読有
- ⑯ Wada N, Kohara M, Ikeda J, Hori Y, Fujita S, Okada M, Ogawa H, Sugiyama H, Fukuhara S, Kanamaru A, Hino M, Kanakura Y, Morii E, Aozasa K. Diffuse large B-cell lymphoma in the spinal epidural space: A study of the Osaka Lymphoma Study Group. Pathol Res Pract 206:439-444, 2010 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① Fujita N, Oritani K, Yokota T, Saito N, Sudo T, Yamawaki K, Kanakura Y: 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)
- ② Tanimura A, Hamanaka Y, Fujita N, Doi Y, Ishibashi T, Sudo T, Matsui K, Ichii M, Saitoh N, Satoh Y, Ezoe S, Yokota T, Oritani K, Shibayama H, Kanakura Y: 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)
- ③ Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Noji H, Kitamura K, Eto T, Ando T, Masuko M, Shibayama H, Hase M, Lan L, Tamburini P, Inazawa J, Kinoshita T, Kanakura Y: A rare genetic polymorphism in C5 confers poor response to the anti-C5 monoclonal antibody eculizumab by nine Japanese patients with PNH. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting (2012. 12. 10, Atlanta, USA)
- ④ Oritani K, Sekine Y, Muromoto R, Fujita N, Matsuda T, Kanakura Y: Involvement of STAP-2 in BCR-ABL-mediated signals for CML development. 第 3 回日本血液学会 (JSH) 国際シンポジウム (2012. 5. 26, 埼玉)
- ⑤ Tanimura A, Hamanaka Y, Tanaka H, Matsumura I, Ishibashi T, Sudo T, Satoh Y, Yokota T, Ezoe S, Oritani K, Shibayama H, Kanakura Y: 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)

- ⑥ Sudo T, Yokota T, Oritani K, Satoh Y, Sugiyama T, Ishida T, Shibayama H, Ezoe S, Ichii M, Tanimura A, Fujita N, Ishibashi T, Matsui K, Hamanaka Y, Nagasawa T, Kanakura Y: 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)
- ⑦ Ishibashi T, Yokota T, Satoh Y, Sudo T, Ichii M, Shibayama H, Ezoe S, Tanimura A, Fujita N, Matsui K, Hamanaka Y, Oritani K, Kanakura Y: 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)
- ⑧ Matsui K, Ezoe S, Shibata M, Otsuka M, Oritani K, Kanakura Y: Energy metabolism of glucose and ATP affects the growth and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells. The 16th Congress of the European Hematology Association (2011. 6. 9, London, UK)
- ⑨ Otsuka M, Mizuki M, Fujita J, Kang S, Kanakura Y: Constitutive active FGFR3 Lys650Glu mutation enhances the bortezomib-sensitivity in plasma cell malignancy. The 16th Congress of the European Hematology Association (2011. 6. 9, London, UK)
- ⑩ Satoh Y, Yokota T, Kondo M, Lai A, Kincade P, Kouro T, Iida R, Kokame K, Miyata T, Sudo T, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y: Satbl promotes hematopoietic stem cell differentiation toward the lymphoid lineages. The American Society of Hematology 53rd Annual meeting (2011. 12. 10, San Diego, USA)
- ⑪ Tanimura A, Kondo Y, Tanaka H, Matsumura I, Ishibashi T, Sudo T, Satoh Y, Yokota T, Ezoe S, Oritani K, Shibayama H, Kanakura Y: An anti-apoptotic molecule, Anamorsin, functions in both iron-sulfur protein assembly and cellular iron homeostasis. The American Society of Hematology 53rd Annual meeting (2011. 12. 10, San Diego, USA)
- ⑫ Sudo T, Yokota T, Sugiyama T, Ishida T,

- Satoh Y, Oritani K, Nagasawa T, Kanakura Y: The endothelial antigen ESAM monitors reversible conversion of hematopoietic stem cells between dormancy and self-renewal. The American Society of Hematology 53rd Annual meeting (2011.12.10, San Diego, USA)
- ⑬ Satoh Y, Yokota T, Tanaka H, Kokame K, Miyata T, Matsumura I, Oritani K, Kanakura Y: SATB1 induces early lymphocyte differentiation from primitive hematopoietic progenitors. 第73回日本血液学会学術集会 (2011.10.14, 愛知)
- ⑭ Shibata M, Ezoe S, Matsui K, Satoh Y, Tanimura A, Matsumura I, Oritani K, Kanakura Y: Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via in vitro analysis of Bcr-Abl signal. 第73回日本血液学会学術集会 (2011.10.14, 愛知)
- ⑮ Yokota T, Satoh Y, Kondo M, Kincade PW, Kouro T, Iida R, Sudo T, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y: Satb1 directs hematopoietic stem cell differentiation toward the lymphoid lineages. 第40回日本免疫学会学術集会 (2011.11.27, 千葉)
- ⑯ Kanakura Y, Ohyashiki K, Shichishima T, Okamoto S, Ando K, Ninomiya H, Kawaguchi T, Nakao S, Nakakuma H, Nishimura J, Kinoshita T, Bedrosian C, Valentine ME, Ozawa K, Omine M: Fatigue and impaired quality of life in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is associated with hemolysis, but not with anemia. The 15th Congress of the European Hematology Association (2010.6.10, Barcelona, Spain)
- ⑰ Tanimura A, Tanaka H, Saito Y, Shibayama H, Matsumura I, Kanakura Y: Essential role of an anti-apoptotic molecule Anamorsin for both intrinsic and extrinsic regulation of murine fetal liver hematopoiesis. The 15th Congress of the European Hematology Association (2010.6.10, Barcelona, Spain)
- ⑱ Shibayama H, Saito Y, Tanimura A, Tanaka H, Matsumura I, Kanakura Y: A cell-death-defying factor, anamorsin, contributes cell growth through binding with PICOT and inactivation of PKCs and p38MAPK. The American

- Society of Hematology 52nd Annual meeting (2010.12.4, Orlando, USA)
- ⑲ Satoh Y, Yokota T, Tanaka H, Kokame K, Miyata T, Matsumura I, Oritani K, Kanakura Y: A chromatin modifier SATB1 promotes lymphocyte production from primitive hematopoietic stem/progenitor cells. The American Society of Hematology 52nd Annual meeting (2010.12.4, Orlando, USA)
- ⑳ 金倉 譲: 骨髄不全の診断と治療. 第42回日本内科学会 近畿生涯教育講演会 (2010.6.20, 大阪)

[図書] (計1件)

- ① Yokota T, Oritani K, Butz S, Ewers S, Vestweber D, Kanakura Y. Advances in Hematopoietic Stem Cell Research, Intech Open Access Publisher, 2012, pp77-88

[その他]

ホームページ等
大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学ホームページ
アドレス: <http://www.hematology.pro>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金倉 譲 (KANAKURA YUZURU)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 20177489

(2) 研究分担者

織谷健司 (ORITANI KENJI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 70324762

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: 80283761

柴山浩彦 (SHIBAYAMA HIROHIKO)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 60346202