

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293220

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 -造血と細胞内鉄代謝における役割-

研究課題名(英文) Analysis of the functions of anti-apoptotic molecule, Anamorsin -the roles in hematopoiesis and cellular iron metabolism-

研究代表者

金倉 譲 (KANAKURA, Yuzuru)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20177489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Anamorsin (AM) コンディショナルノックアウトマウスを作製し、特定の細胞組織のみのAMを欠損させ、それぞれの細胞組織でのAMの機能を解析した。造血幹細胞のAMを欠損させると貧血をきたし胎生致死となり、通常のAM欠損マウスと同様のフェノタイプを示した。成体マウスの造血細胞のAMを欠損させると、造血幹細胞のアポトーシスの増加がみられた。以上より、AMは胎児期および成体、両方の造血幹細胞で重要な役割を果たしていることが証明された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have generated Anamorsin (AM) conditional knock-out mice, which delete AM in the specific organ by mating the organ-specific Cre recombinase transgenic mice, and analyzed the functions of AM in the specific organ. The defect of AM in the embryonic hematopoietic stem cells leads to anemia and embryonic lethality, which are identical with the phenotypes of AM deficient mice. The induction of AM deficiency in the hematopoietic cells in the adult mice lead to the increase of apoptosis in the hematopoietic stem cells. From these data, it was shown that AM plays important roles in both of the embryonic and adult hematopoietic stem cells.

研究分野：血液内科

キーワード：アナモルシン コンディショナルノックアウトマウス 造血幹細胞 鉄・硫黄クラスター アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

アナモルシン (Anamorsin, AM) は申請者らがマウス造血因子依存性細胞株 Ba/F3 に造血因子非依存性の生存を可能とする分子として単離した新規の抗アポトーシス分子である。AM は既知の抗アポトーシス分子と類似の構造を有さず、抗アポトーシス機能の詳細は明らかでなかった。AM 欠損マウスは、身体が小さく、胎児肝での二次造血が障害され、胎生後期に致死となる。また、AM 欠損マウスの胎児肝から得た赤芽球は骨髓異形成症候群 (MDS) でみられる赤芽球と似た巨赤芽球様形態を示す (J Exp Med 199:581, 2004)。AM 欠損マウスから得た胎児線維芽細胞 (MEF) は、野生型マウスの MEF に比し、細胞増殖が遅い。AM KO MEF を用いて検討した結果、細胞内シグナル伝達分子の PKC δ と p38 MAPK のリン酸化が WT MEF と比較し、亢進していること、さらに、その下流でサイクリン D1 の発現が抑制されていることを見出し、AM は細胞内のシグナル伝達分子の活性化を制御することで、細胞増殖にも関わる分子であることを明らかにした (BBRC 405:303, 2011)。さらに AM の機能を明らかにする目的で AM と結合する分子を Yeast-two-hybrid 法で探索したところ、Picot という PKC δ と結合し、PKC δ の機能を抑制することが知られている分子を単離した (BBRC 408:329, 2011)。

AM の yeast ホモログである Dre2 が細胞内において鉄制御蛋白 1,2 (Iron regulatory protein, IRP-1,2) の機能を制御するなどの役割をはたす鉄硫黄 (Fe-S) クラスタ形成に必須の分子であることが報告され (Mol Cell Biol 28:5569, 2008) 申請者らも AM 欠損マウスから得られた細胞を用い、IRP-1 やキサンチンオキシダーゼなどの Fe-S クラスタ形成の機能を WT の細胞と比較したところ、それらの蛋白の活性が低下していることを見出した。レトロウィルスベクターを用いて、AM 欠損細胞に AM を発現回復させたと

ころ、それらの蛋白の活性が回復したことから、AM は Dre2 同様に Fe-S クラスタ形成に関わる分子であることが明らかとなった。また、AM は IRP-1 の機能を制御することで、細胞内の鉄代謝に深く関わることも見出した。Fe-S クラスタ形成は、細胞内で種々の生命現象に関わっており、特に DNA 複製、修復に関わる DNA ポリメラーゼ、DNA リボヌクレアーゼ、DNA ヘリカーゼなどの酵素も Fe-S クラスタ形成に関与していることが知られている。AM 欠損細胞においては、Fe-S クラスタ形成がうまくいかなくなり、それらの酵素活性も低下している可能性がある。このことが、細胞の生存、増殖に影響している可能性が強うかがわれる。申請者らが単離した AM は、抗アポトーシス作用、細胞増殖作用など、当初見出した機能に加えて、Fe-S クラスタ形成に関わる分子として、種々の細胞の、種々の生命現象に関わっている可能性がある。

2. 研究の目的

申請者らが、抗アポトーシス分子として単離したアナモルシン (Anamorsin, AM) は既知の抗アポトーシス分子とは類似の構造をもたない新規の分子である。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傷害され、胎生後期に致死となる。申請者らは AM が AM の yeast ホモログである Dre2 と同様に鉄硫黄 (Fe-S) クラスタ形成に関与することを明らかにし、また、Fe-S クラスタ形成のみではなく、細胞内の鉄代謝に重要な役割を果たしていることも明らかにしてきた。本研究では、AM のコンディショナルノックアウトマウスを新たに作製し、細胞種特異的に Cre リコンビナーゼを発現する種々のトランスジェニックマウスと交配することで、各種の造血細胞における AM の機能を解析する。さらに、成体マウスの造血幹細胞において AM を欠損させることで、骨髓異形成症候群 (MDS) の病態を示すモデルマウスが作製

できるか検討する予定である。

3. 研究の方法

(1) AMのコンディショナルノックアウトマウスの作製

通常のノックアウトマウスを作製すると、同じ実験技術を用いておこなうが、targeting construct を作製する際に、loxP 配列を挿入することによって、あとで Cre recombinase を作用させることで、細胞特異的、また時間特異的に AM 遺伝子を欠損させることが可能となる。AM の Exon4 を loxP 配列で挟んだ Targeting vector を作製し、ES 細胞株にトランスフェクションし、目的の遺伝子座に target した ES 細胞株を選択する（PCR 法やサザンブロッティング法を用いる）。

Cre リコンビナーゼを作用させることで、AM 蛋白の発現が半分減ることを確認する。目的通りに得られた ES 細胞株の染色体に異常がないことを確認し、野生型マウスの受精卵（桑実胚）に注入する。仮親に受精卵（桑実胚）を移植し、誕生したキメラマウスと野生型マウスを交配し、ヘテロ欠損マウスを得る。ヘテロ欠損マウス同士を交配することで、ホモの AM のコンディショナルノックアウトマウス（AM Flox/Flox マウス）を得る。

(2) 造血細胞系統特異的 AM 欠損マウスの作製と表現型の解析

AM のコンディショナルノックアウトマウス（AM Flox/Flox マウス）と、各種の造血細胞系統特異的に活性化されているプロモーターの下流に Cre リコンビナーゼを発現させたトランスジェニックマウスを交配し、造血細胞系統特異的 AM 欠損マウスを作製する。具体的には、造血幹細胞、B リンパ球の AM を欠損させるために、Tie-2 Cre Tg マウス、CD19 Cre Tg マウスと交配し、目的のマウスを作製し、その表現型を解析する。また、Mx Cre Tg マウスと交配し、成体となった特定の時期に

IFN または plpC 処理をおこない、AM を欠損させることによって、成体での造血細胞の AM の機能を評価する。

(3) 肝臓特異的 AM 欠損マウスの解析

生体レベルにおいて、鉄の吸収、排泄の代謝制御および鉄の恒常性維持については、肝細胞が産生するヘプシジンが中心的役割を担い、腸管上皮細胞に作用し、主に鉄の吸収の制御によってなされている。肝臓特異的に AM を欠損させるマウス（Alb Cre Tg-AM Flox/Flox マウス）を作製し、生体レベルの鉄の代謝における AM の役割を解析する。

(4) 骨髄異形成症候群（MDS）患者赤芽球における AM の発現の検討

AM 欠損マウスの胎児肝の細胞を解析したところ、赤芽球の成熟障害および、巨赤芽球様の細胞が多くみられ、MDS 患者の骨髄の赤芽球の形態と似通っている。そこで、MDS 患者の赤芽球の AM の発現量は減少しているのではないかと思われた。MDS 患者の貧血レベルと赤芽球の AM の発現量を比較検討する。

4. 研究成果

(1) AMのコンディショナルノックアウトマウスの作製

AM の Exon4 を loxP 配列で挟んだ Targeting vector を作製し、相同組み換えにより、目的の位置に target された ES 細胞株を得ることができた。その ES 細胞株をマウス受精卵に注入し、キメラマウスを作製し、その後、野生型マウスと交配し、ヘテロ欠損マウスを得ることができた。（germ line transmission も成功した）さらに、ヘテロ欠損マウス同士を交配することで、AM コンディショナル KO マウス（AM Flox/Flox マウス）を作製した。

目的の遺伝子改変ができたかどうかは、特定の遺伝子配列に設定したプローブおよびプライマーを用いて、それぞれサザンブロットおよび PCR をおこない確認した。

(2) 造血細胞系統特異的 AM 欠損マウスの作製と表現型の解析

AM Flox/Flox マウスが作製できたことで、細胞種特異的に Cre リコンビナーゼを発現する各種トランスジェニック (Tg) マウスと交配し、特定の細胞種のみで AM を欠損するマウスを作製し、解析をおこなった。

まずは、造血幹細胞特異的に AM を欠損させるため、Tie-2 Cre Tg マウスと交配した。その結果、目的のマウスは、胎生後期に貧血を認め、胎生致死となった。この特徴は、通常の AM 欠損マウスとほぼ同じであった。AM 欠損マウスも、胎生後期に致死となるが、これまでその死因が貧血によるものか、血液以外の臓器の異常によるものか不明であったが、Tie2-Cre Tg/AM Flox/Flox マウスの表現型が通常の AM 欠損マウスとほぼ同じであったことから、貧血が死因であることが判明した。

次に、成体マウスの造血細胞において、AM を欠損させた場合の表現型をみるため、Mx Cre Tg マウスと交配した。作製した Mx Cre Tg/AM Flox/Flox マウスに pIpC を投与したところ、造血幹細胞数の減少および、造血幹細胞への ROS (活性酸素種) の蓄積およびアポトーシスをおこす細胞の増加を認めた。このことから、胎児期の造血のみではなく、成体造血においても AM が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今後、さらに詳細な解析をおこなっていく予定である。

次に、CD19 Cre Tg マウスと交配し、CD19 陽性 B リンパ球の AM を欠損させた場合の表現型を解析した。末梢血、骨髄、脾臓の各分化段階の B リンパ球の数を調べたところ、成熟した B リンパ球の数が有意に低下していることが判明した。さらに、複数の細胞表面抗原を用いたフローサイトメトリーによる詳細な B リンパ球の分画をおこなったところ、脾臓における最終分化段階の B リンパ球 (FOL1 B リンパ球) のみが特異的に減少していることがわかった。また、形質細胞の前段階の

形質芽細胞も減少しており、その結果として、IgM や IgG3 などの免疫グロブリン蛋白も有意に減少していることもわかった。

これらのフェノタイプは、BCR-BTK のシグナルを阻害した際に認められるものと似通っており、Anamorsin が BCR-BTK シグナル伝達に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

(3) 肝臓特異的 AM 欠損マウスの解析

肝細胞特異的に AM を欠損させる目的にて、アルブミンプロモーターの下流に Cre リコンビナーゼを発現する Alb Cre Tg マウスと AM Flox/Flox マウスを交配した。

目的のマウスは、メンデル比通り生まれた。また、成体マウスの肝臓の組織像を形態的に観察したが、目立った異常は認めていない。今後、鉄負荷などをおこなうことで、AM の鉄代謝への影響 (生体レベル) を検討する予定である。

(4) 骨髄異形成症候群 (MDS) 患者赤芽球における AM の発現の検討

腎性貧血を呈し、エリスロポエチンの投与を受けている患者の骨髄中の赤芽球の AM の発現レベルは、貧血のない患者の赤芽球と比較し、亢進していることがわかった。その患者と同程度の貧血レベルの MDS 患者の骨髄中の赤芽球の AM 発現レベルは低いこともわかった。以上より、MDS の赤芽球では何らかの原因により、AM の発現が低下しており、そのことが無効造血につながる可能性が示唆された。

現段階では、少数例をパイロット的に検討しただけであり、今後は、症例数を増やし、貧血のレベルと AM 発現量との相関やエリスロポエチン治療の効果との相関などを検討していく予定である。

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10件)

- (1) Yokota T, Oritani K, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Habuchi Y, Ichii M, Fukushima K, Okuzaki D, Tomizuka K, Yamawaki K, Kakitani M, Shimono A, Morii E, Kincade PW, Kanakura Y. Estrogen-inducible sFRP5 inhibits early B-lymphopoiesis in vivo, but not during pregnancy. *Eur J Immunol* 45(5): 1390-1401, 2015. doi: 10.1002/eji.201444939.
- (2) Fujita N, Ichii M, Maeda T, Saitoh N, Yokota T, Yamawaki K, Kakitani M, Tomizuka K, Oritani K, Kanakura Y. Identification of osteoblast stimulating factor 5 as a negative regulator in the B-lymphopoietic niche. *Exp Hematol* 43(11): 963-973, 2015. doi:10.1016/j.exphem.2015.07.002.
- (3) Tanimura A, Shibayama H, Hamanaka Y, Fujita N, Ishibashi T, Sudo T, Yokota T, Ezoe S, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kanakura Y. The anti-apoptotic gene Anamorsin is essential for both autonomous and extrinsic regulation of murine fetal liver hematopoiesis. *Exp Hematol* 42: 410-422, 2014. doi: 10.1016/j.exphem.2014.01.002
- (4) Yun N, Lee YM, Kim C, Shibayama H, Tanimura A, Hamanaka Y, Kanakura Y, Park IS, Jo A, Shin JH, Ju C, Kim WK, Oh YJ. Anamorsin, a novel caspase-3 substrate in neurodegeneration. *J Biol Chem* 289:22183-22195, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.552679
- (5) Satoh Y, Yokota T, Sudo T, Kondo M, Lai A, Kincade PW, Kouro T, Iida R, Kokame K, Miyata T, Habuchi Y, Matsui K, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y. The

Satb1 Protein Directs Hematopoietic Stem Cell Differentiation toward Lymphoid Lineages. *Immunity* 38:1105-1115, 2013. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.014

〔学会発表〕(計15件)

- (1) Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M, Sudo T, Satoh Y, Doi Y, Tanimura A, Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. (発表日 12.5) ESAM is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias. The American Society of Hematology 57th Annual Meeting (2015.12.5-8, Orange County Convention Center, Orlando, FL, USA)
- (2) Doi Y, Yokota T, Ishibashi T, Satoh Y, Ichii M, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. (発表日 12.6) SATB1 expression marks lymphoid lineage biased hematopoietic stem cells in mouse bone marrow. The American Society of Hematology 57th Annual Meeting (2015.12.5-8, Orange County Convention Center, Orlando, FL, USA)
- (3) Tanimura A, Shibayama H, Hamanaka Y, Fujita N, Nagate Y, Ishibashi T, Ichii M, Yokota T, Ezoe S, Oritani K, Kanakura Y (発表日 5.23) An anti-apoptotic molecule, Anamorsin, is upregulated in anemia and essential for imperative erythropoiesis. The 6th JSH international symposium 2015 (2015.5.22,23, Karuizawa Prince Hotel West, Karuizawa, Japan)
- (4) Hamanaka Y, Shibayama H, Tanimura A, Yokota T, Ezoe S, Saito N, Ichii M,

- Matsui K, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Nagate Y, Takemoto M, Oritani K, Kanakura Y (発表日 12.8) Anamorsin overexpression leads to dysregulation of lipopolysaccharide-stimulated B cell proliferation through Ras signaling. The American Society of Hematology 56th Annual Meeting (2014.12.6-9, Moscone Center, San Francisco, CA, USA)
- (5) Tanimura A, Shibayama H, Hamanaka Y, Fujita N, Nagate Y, Ishibashi T, Saitoh N, Ichii M, Yokota T, Ezoe S, Oritani K, Kanakura Y (発表日 12.8) An anti-apoptotic molecule, Anamorsin, is upregulated in anemia and essential for imperative erythropoiesis. The American Society of Hematology 56th Annual Meeting (2014.12.6-9, Moscone Center, San Francisco, CA, USA)
- (6) 金倉 讓 (発表日 10.31) Succession of tradition and challenges towards the future: a personal view. 第76回日本血液学会学術集会(2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪)
- (7) Tanimura A, Hamanaka Y, Fujita N, Nagate Y, Ishibashi T, Matsui K, Saitoh N, Ichii M, Ezoe S, Yokota T, Oritani K, Shibayama H, Kanakura Y (発表日 10.31) An anti-apoptotic molecule, Anamorsin, is upregulated in anemia and essential for erythropoiesis. 第76回日本血液学会学術集会(2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪)
- (8) 濱中有理, 柴山浩彦, 谷村 朗, 横田貴史, 江副幸子, 齊藤則充, 一井倫子, 松井敬子, 数藤孝雄, 石橋知彦, 土居由貴子, 長手泰宏, 竹本雅子, 織谷健司, 金倉 讓 (発表日 11.2) アナモルシント

ランスジェニックマウスを用いたアナモルシンの機能解析. 第76回日本血液学会学術集会(2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪)

- (9) Ishibashi T, Yokota T, Ichii M, Satoh Y, Sudo T, Doi Y, Fujita N, Nagate Y, Hamanaka Y, Matsui K, Tanimura A, Saitoh N, Ezoe S, Shibayama H, Kincade PW, Oritani K, Kanakura Y (発表日 12.8) Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Marks Human Hematopoietic Stem Cells Regardless Of The HSC Sources. The American Society of Hematology 55th Annual Meeting (2013.12.7-10, Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, LA, USA)

〔その他〕

大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科ホームページ www.hematology.pro

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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

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

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