

令和元年5月23日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09871

研究課題名(和文)リンパ球の分化・増殖におけるアナモルシンの役割の解明

研究課題名(英文)Clarification of the roles of anamorsin in the lymphocytes differentiation and proliferation

研究代表者

柴山 浩彦 (SHIBAYAMA, HIROHIKO)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60346202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが、抗アポトーシス分子としてクローニングしたAnamorsin(AM)は、鉄・硫黄(Fe-S)クラスターを形成する分子として機能していることが示されている。In vivoでの種々の細胞におけるAMの機能を解析し、それらの細胞において、重要な働きをしているFe-Sクラスター蛋白を明らかにする目的にて、AMコンディショナルノックアウトマウス(AM Flox/Floxマウス)を作製した。本研究では、Bリンパ球特異的にAMを欠損させたマウスを作製し、そのフェノタイプの解析をおこなった。最終分化段階のFOLI Bリンパ球が低下し、その細胞ではP38MAPKの発現低下がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉄・硫黄(Fe-S)クラスター分子の形成にアナモルシン(AM)は必須の分子である。興味深いことに細胞種ごとでAMが関連するFe-Sクラスター分子は異なっており、それらを明らかにすることは、AMを標的とした薬剤の開発に寄与すると考えられる。本研究では、遺伝子改変マウスを用いることでBリンパ球の分化・増殖においては、AMはP38MAPKの発現に強く関わっていることが明らかとなった。P38MAPKはシグナル伝達分子の一つだが、AMが欠損すると、その発現が低下し、Bリンパ球の分化が停止することが明らかとなったことで、AMを標的とした薬剤でBリンパ球の分化を制御できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Anamorsin (AM), an anti-apoptotic molecule, which we have identified was revealed to be the molecule that works related to iron-sulfur (Fe-S) proteins biosynthesis. In order to clarify the functions of AM in the various cells in vivo and the Fe-S cluster proteins which play important roles in those cells, we produced the AM conditional knock out mice (AM Flox/Flox mice). In this study, we mated CD19 Cre Tg mice with AM Flox/Flox mice to produce B lymphocytes specific AM deficient mice, and analyzed the phenotypes of these mice. We found that the number of the terminal differentiated B lymphocytes (FOLI cells) was markedly decreased in those mice. Furthermore, we found that the expression of P38MAPK was remarkably decreased in both mRNA and protein levels in the AM deficient FOLI cells. From those results, it was shown that AM regulates the expression of P38MAPK in the terminal differentiated B lymphocytes (FOLI cells).

研究分野：血液内科

キーワード：アナモルシン 鉄・硫黄クラスター 遺伝子改変マウス Bリンパ球 P38MAPK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者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、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 Anamorsin 遺伝子欠損 (KO) マウスは、コントロールの野生型 (WT) 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、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 (J Exp Med 199:581, 2004, Exp Hematol 42:410, 2014)。

申請者は 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 (BBRC 408:329, 2011)。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いる。Picot KO マウスについての報告もなされ (Chahら、J Mol Cell Cardiol, 2008)、Picot KO マウスは AM KO マウスと酷似しており、身体が小さく胎生後期に致死となることが示されている。このことは Anamorsin と Picot の結合は、細胞の生存・増殖に極めて重要である可能性を示唆している。

最近になり Yeast の Anamorsin 相同分子である Dre2 が鉄・硫黄 (Fe-S) クラスタを形成し、細胞内での鉄代謝、エネルギー産生、酸化ストレスの制御、リボソーム生成、DNA 修復など種々の細胞現象に関わっていることが示された (Zhag Y ら、Mol Cell Biol, 2008)。申請者らも、Anamorsin KO 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 クラスタ蛋白の機能を 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、Anamorsin KO 細胞に Anamorsin 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、Anamorsin 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、Anamorsin は IRP-1 の機能を制御することで、細胞内の鉄代謝に関わることも見出している。

2. 研究の目的

申請者らは、種々の細胞における Anamorsin の機能を解析する目的で、Anamorsin コンディショナルノックアウトマウス (Anamorsin Flox/Flox マウス) を作製した。この遺伝子改変マウスと CD19Cre トランスジェニックマウスと交配することで、CD19 陽性 B リンパ球特異的に Anamorsin を欠損させることができた。その表現型を解析したところ、最終分化段階の B リンパ球が減少することが明らかとなり、B リンパ球においても Anamorsin が重要な役割を果たしていることが予想された。本研究では、B、T リンパ球および単球特異的 Anamorsin 欠損マウスを作製し、それぞれのマウスにおける B、T リンパ球の分化、増殖について詳細に解析する予定である。また、それらのマウスの表現型がヒトの疾患に類似するようであれば、ヒトの疾患における Anamorsin の関わりをヒトの検体を用いて解析する予定である。

3. 研究の方法

(1) B リンパ球特異的 Anamorsin 欠損マウスの解析

申請者らはすでに、CD19 Cre トランスジェニックマウスと Anamorsin Flox/Flox マウスを交配し、CD19 Cre/Anamorsin Flox/Flox マウスを作製し、CD19 陽性 B リンパ球特異的に Anamorsin を欠損させたマウスを得ている。このマウスを詳細に解析することで、B リンパ球における Anamorsin の機能を明らかにする。

(2) T リンパ球特異的 Anamorsin 欠損マウスの作製と解析

LCK Cre トランスジェニックマウスおよび CD4 Cre トランスジェニックマウスと Anamorsin Flox/Flox マウスを交配し、CD3 陽性 T リンパ球および CD4 陽性 T リンパ球特異的に Anamorsin を欠損させたマウスを作製する。まずは、CD3 Cre/Anamorsin Flox/Flox マウスの胸腺・骨髄・末梢血から得た T リンパ球を細胞表面に発現している分子によって、各分化段階の T リンパ球の割合、細胞数を検討する。次に、本マウスおよび CD4 Cre/Anamorsin Flox/Flox マウスを用いた免疫能の解析をおこなう。

(3) 単球特異的 Anamorsin 欠損マウスの作製と解析

CD11c Cre トランスジェニックマウスと Anamorsin Flox/Flox マウスを交配し、単球特異的に Anamorsin を欠損させたマウスを作製する。まずは、CD11c Cre/Anamorsin Flox/Flox マウスの骨髄・末梢血の単球の数を評価する。次に、本マウスを LPS などで刺激した際のサイトカイン分泌能や、抗原負荷した際の抗原提示能などを解析する。

(4) B、T リンパ球および単球特異的 Anamorsin 欠損マウスの表現型と類似するヒト疾患の検索

上記 (1) ~ (3) のマウスの表現型と、主に免疫不全型の異常が予想されるが、類似するヒトの疾患が存在する場合は、その疾患の患者検体を入手し、Anamorsin の発現レベルや Anamorsin 遺伝子配列の変異の有無を調べる。

4. 研究成果

(1) Bリンパ球特異的 Anamorsin 欠損マウスの解析

Bリンパ球特異的に Anamorsin を欠損したマウスを、CD19 Cre トランスジェニック (Tg) マウスと Anamorsin Flox/Flox マウスを交配し作製したところ、脾臓に局在する FOL の分化段階の Bリンパ球が極端に減少していることが明らかとなった。また、その分化段階にて、アポトーシスの亢進がみられることも確認した。その分化段階の Anamorsin 欠損 Bリンパ球と正常 Bリンパ球の遺伝子発現の違いを RNA seq をおこない比較し、発現に差のあった分子の中で、Bリンパ球の分化・増殖に関与するシグナル伝達 に関わる分子群にしばって検討したところ、FOLI 細胞のみならず、FOLI の前分化段階の T1 細胞においても、P38MAPK 遺伝子の発現が有意に低下していた。ウェスタンブロット法をおこない、蛋白レベルにおいても P38MAPK の発現は低下していることが示され、Bリンパ球の最終分化における Anamorsin の標的蛋白は P38MAPK であることが明らかとなった。P38MAPK の発現は、正常 Bリンパ球においても、T1、T2 から FOLI に分化する際に、上昇することがわかっており、Anamorsin が欠損することで、この発現上昇が抑制されることが FOLI 細胞の低下につながっていると考えられた。

(2) Tリンパ球特異的 Anamorsin 欠損マウスの作製と解析

Tリンパ球特異的に Anamorsin を欠損したマウスを、CD4 Cre Tg マウスおよび Lck Cre Tg マウスと Anamorsin Flox/Flox マウスを交配し作製したところ、両方の遺伝子改変マウスともに、胸腺の萎縮、末梢血中の Tリンパ球の減少を認めた。興味深いことに、CD4 陽性 Tリンパ球特異的に Anamorsin を欠損させたマウスの末梢血でも、CD4 陽性 Tリンパ球のみならず、CD8 陽性 Tリンパ球の減少もみられた。このことは、Tリンパ球の胸腺内分化における CD4, CD8 両陽性 Tリンパ球の分化段階において、Anamorsin が重要な役割を果たしていることが推定された。(1)の研究と同様に、Anamorsin 欠損 CD4, CD8 両陰性 Tリンパ球、CD4, CD8 両陽性 Tリンパ球と正常の CD4, CD8 両陰性 Tリンパ球、CD4, CD8 両陽性 Tリンパ球の遺伝子発現を RNA seq をおこなうことで、CD4, CD8 両陰性 Tリンパ球から両陽性 Tリンパ球に分化する段階において、発現変化する分子群について検討をおこなっている。

(3) 単球特異的 Anamorsin 欠損マウスの作製と解析

(4) B、Tリンパ球および単球特異的 Anamorsin 欠損マウスの表現型と類似するヒト疾患の検索

(3)(4)の研究については、今回の研究期間では、おこなえなかったが、(1)(2)の研究結果からも、申請者が作製した Anamorsin Flox/Flox マウスと、細胞種特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Tg マウスを交配することで、標的とする細胞種においてのみ Anamorsin を欠損させることが明らかとなった。また、それで作製したマウスの表現型を解析することによって、標的とした細胞の in vivo における Anamorsin の機能を明らかにすることが可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Doi Y, Yokota T, Satoh Y, Okuzaki D, Tokunaga M, Ishibashi T, Sudo T, Ueda T, Shingai Y, Ichii M, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H, Kohwi-Shigematsu T, Takeda J, Oritani K, Kanakura Y. Variable SATB1 Levels Regulate Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity with Distinct Lineage Fate. *Cell Rep* 23(11): 3223-3235, 2018. 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2018.05.042

Nakaya A, Yagi H, Kaneko H, Kosugi S, Kida T, Adachi Y, Shibayama H, Kohara T, Kamitsuji Y, Fuchida SI, Uoshima N, Kawata E, Uchiyama H, Shimura Y, Takahashi T, Urase F, Ohta K, Hamada T, Miyamoto K, Kobayashi M, Shindo M, Tanaka H, Shimazaki C, Hino M, Kuroda J, Kanakura Y, Takaoari-Kondo A, Nomura S, Matsumura I; Kansai Myeloma Forum Investigators. Retrospective analysis of primary plasma cell leukemia in Kansai Myeloma Forum registry. *Leuk Res Rep*, 10: 7-10, 2018. 査読有
DOI: 10.1016/j.lrr.2018.07.001

Ishibashi T, Yokota T, Satoh Y, Ichii M, Sudo T, Doi Y, Ueda T, Nagate Y, Hamanaka Y, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. Identification of MS4A3 as a reliable marker for early myeloid differentiation in human hematopoiesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 495(3): 2338-2343, 2018. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.117

Ishikawa J, Matsumura I, Kawaguchi T, Kuroda J, Nakamae H, Miyamoto T, Matsuoka K, Shibayama H, Hino M, Hirase C, Kamimura T, Shimose T, Akashi K, Kanakura Y. Efficacy and safety of switching to nilotinib in patients with CML-CP in major molecular response to imatinib: the results of multicenter phase II trial (NLSw trial). *Int J Hematol*, 107(5): 535-540, 2018. 査読有
DOI: 10.1007/s12185-018-2401-y

Matsumura-Kimoto Y, Kuroda J, Kaneko H, Kamitsuji Y, Fuchida SI, Nakaya A, Shibayama H, Uoshima N, Yokota I, Uchiyama H, Yagi H, Kosugi S, Matsui T,

Ishikawa J, Matsuda M, Ohta K, Iida M, Tanaka H, Kobayashi M, Wada K, Shimazaki C, Nomura S, Imada K, Hino M, Matsumura I, Kanakura Y, Takaori-Kondo A; Kansai Myeloma Forum Investigators. Pomalidomide with or without dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma in Japan: a retrospective analysis by the Kansai Myeloma Forum. *Int J Hematol*, 107(5): 541-550, 2018. 査読有
DOI: 10.1007/s12185-018-2416-4

Hosokawa M, Kashiwagi H, Nakayama K, Sakuragi M, Nakao M, Morikawa T, Kiyokawa T, Aochi H, Nagamine K, Shibayama H, Tomiyama Y. Distinct effects of daratumumab on indirect and direct antiglobulin tests: a new method employing 0.01 mol/L dithiothreitol for negating the daratumumab interference with preserving K antigenicity (Osaka method). *Transfusion*, 58(12):3003-3013, 2018. 査読有
DOI: 10.1111/trf.14900

Okada M, Imagawa J, Tanaka H, Nakamae H, Hino M, Murai K, Ishida Y, Kumagai T, Sato S, Ohashi K, Sakamaki H, Wakita H, Uoshima N, Nakagawa Y, Minami Y, Ogasawara M, Takeoka T, Akasaka H, Utsumi T, Uike N, Sato T, Ando S, Usuki K, Mizuta S, Hashino S, Nomura T, Shikami M, Fukutani H, Ohe Y, Kosugi H, Shibayama H, Maeda Y, Fukushima T, Yamazaki H, Tsubaki K, Kukita T, Adachi Y, Nataduka T, Sakoda H, Yokoyama H, Okamoto T, Shirasugi Y, Onishi Y, Nohgawa M, Yoshihara S, Morita S, Sakamoto J, Kimura S; DADI Trial Group, Japan. Final 3-year Results of the Dasatinib Discontinuation Trial in Patients With Chronic Myeloid Leukemia Who Received Dasatinib as a Second-line Treatment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 18(5): 353-260, 2018. 査読有
DOI: 10.1016/j.clml.2018.03.004

Morita Y, Maeda Y, Yamaguchi T, Urase F, Kawata S, Hanamoto H, Tsubaki K, Ishikawa J, Shibayama H, Matsumura I, Matsuda M. A 5-day regimen of azacitidine for lower-risk myelodysplastic syndromes (RA or RARS): a prospective single-arm phase 2 trial. *Cancer Sci*, 109(10): 3209-3215, 2018. 査読有
DOI: 10.1111/cas.13739

Maruyama D, Tsukasaki K, Uchida T, Maeda Y, Shibayama H, Nagai H, Kurosawa M, Suehiro Y, Hatake K, Ando K, Yoshida I, Hidaka M, Murayama T, Okitsu Y, Tsukamoto N, Taniwaki M, Suzumiya J, Tamura K, Yamauchi T, Ueda R, Tobinai K. Multicenter phase 1/2 study of forodesine in patients with relapsed peripheral T cell lymphoma. *Ann Hematol*, 97(12):2529-2530, 2018. 査読有
DOI: 10.1007/s00277-018-3418-2

〔学会発表〕(計4件)

谷村 朗, 柴山浩彦 抗アポトーシス分子アナモルシンによる細胞内鉄代謝制御

第42回日本鉄バイオサイエンス学術集会(招待講演)(2018.9.1-2(発表日 9.2)), 金沢医科大学, 石川)

谷村朗, 柴山浩彦, 倉重隆明, 濱中有理, 新開泰宏, 西東秀晃, 戸田淳, 上田智朗, 長手泰宏, 土居由貴子, 一井倫子, 横田貴史, 江副幸子, 金倉讓 コンディショナルノックアウトマウスを用いた抗アポトーシス分子アナモルシンの成体造血での役割の解析. 第79回日本血液学会学術集会(2017.10.20-22(発表日 10.20)), 東京フォーラム, 東京)

濱中有理, 柴山浩彦, 谷村朗, 横田貴史, 江副幸子, 一井倫子, 石橋知彦, 土居由貴子, 長手泰宏, 織谷健司, 金倉讓 Anamorsin plays important roles in B-cell development. 第78回日本血液学会学術集会(2016.10.13-15(発表日 10.14)), パシフィコ横浜, 神奈川)

Hamanaka Y, Shibayama H, Tanimura A, Yokota T, Ezoe S, Ichii M, Ishibashi T, Doi Y, Nagate Y, Oritani K, Kanakura Y. Anamorsin is essential for B-cell terminal differentiation. 21st Congress of European Hematology Association (2016.6.9-12(発表日 6.11)), the Bella Center, Copenhagen, Denmark.

〔その他〕

ホームページ等

www.hematology.pro

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：織谷 健司

ローマ字氏名：(ORITANI, kenji)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70324762

研究分担者氏名：金倉 譲

ローマ字氏名：(KANAKURA, yuzuru)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：20177489

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。