

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09903

研究課題名(和文) 条件付き遺伝子欠損マウスを用いた赤血球分化におけるアナモルシンの役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of Anamorsin in erythrocyte differentiation using conditional knockout mice.

研究代表者

倉重 隆明 (Kurashige, Ryumei)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00791633

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単離したアナモルシン(Anamorsin, AM)は、欠損マウスにおいて極度の貧血から胎生後期に致死となる。AMの赤血球造血への関与を検討するため、AMを適時欠損できるコンディショナルノックアウトマウスを作製し、成体でのAM欠損により貧血を呈することを見出した。また、AMの細胞内で鉄硫黄クラスター形成タンパクとしての機能を果たす可能性について、分子細胞学的な検討を行いPICOTやNdor1などとの結合を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、KOマウスでは解析が困難であった赤血球分化におけるAMの役割を条件付きAM欠損マウスによって克服するものである。その結果、成体造血においてもAMが重要な役割を呈していることを示した。また、細胞内でどのように機能するかについては鉄硫黄クラスター形成に関与すると考えられる因子との結合も見出した。また、以前より慢性貧血ではAMの発現が増加、AM欠損赤芽球はMDSにおける赤芽球様変化を認めることから、ヒト貧血疾患における新たな治療ターゲットとなる可能性も考えられた。

研究成果の概要(英文)：Anamorsin (AM), which the applicants isolated as an anti-apoptotic molecule, is lethal from extreme anemia to late embryonic stages in deficient mice. To investigate the involvement of AM in erythropoiesis, we generated AM conditional knockout mice and found that AM deficiency in adults resulted in anemia. In addition, the possibility of AM to function as an iron-sulfur cluster-forming protein in cells was investigated by molecular cytology and found to bind to PICOT and Ndor1.

研究分野：血液内科

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アナモルシン(Anamorsin,AM)は、申請者が単離した新規の抗アポトーシス分子である。AM 遺伝子欠損(KO)マウスは著明な貧血をきたすという表現型を認め、胎児肝での二次造血に必須であることを明らかにした(J Exp Med 99:581,2004,Exp Hematol 42:410,2014)。

また、AM KO マウスの胎仔肝から得られた赤芽球は、MDS で認める巨赤芽球様の変化を認めていた。申請者らは、AM は赤芽球系細胞において前赤芽球を中心に強く発現しているが、分化が進むにつれて発現が低下することを見出している。瀉血による急性貧血や抗癌剤による骨髄抑制、EPO 投与下など赤血球産生が促進される状況下では、AM の発現が亢進していた。また、K562 細胞から赤血球分化させる実験系において、AM を Knock down した K562 細胞では赤血球分化は阻害された。これらにより、AM は赤血球分化において非常に重要な働きを担っていることが強く示唆された。

細胞内での AM の機能を検討する際に yeast ホモログである Dre2 の鉄・硫黄クラスター形成機能に着目した。Dre2 は鉄・硫黄(Fe-S)クラスターを形成し、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ている。た(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、Dre2 同様に Fe-S クラスター形成に関わる分子であることが明らかとした。また、分子細胞学的な検討として、Picot(thioredoxin-like2)という PKC と結合し、その機能を抑制する分子を単離した (BBRC 408:329,2011)。Picot KO マウスは、AM KO マウスと酷似して、身体が小さく胎生後期に致死となる (J Mol Cell Cardiol 408:329, 2008)。このことは、AM 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。

AM は methyl transferase motif を持つことが分かっており、DNA のメチル化への関与が示唆されている。AM は通常細胞質に多く発現しているが、核にも一部発現を認めており、酸化ストレス下では AM の核内の局在が増加したことが報告されている (J Neural Transm 118:433,2011)。申請者らも K562 細胞からの赤血球分化実験系において、分化による核内への AM の発現増加を確認している。EPO 投与による赤血球生成亢進の際にも同様の知見を得ている。以上から、AM の作用機序として核内への移行と DNA メチル化が重要であることが示唆された。

以上のように、申請者が抗アポトーシス分子として単離した AM は、PKC などの細胞シグナルの活性化や自身の核内移行による DNA メチル化、Fe-S クラスターによる細胞内鉄代謝における関与などを通して、造血、特に赤血球分化に関わる分子として重要な役割を持つことが示唆される。しかし、AM KO マウスが胎生致死であることが問題となり、成体における AM の解析には限界があった。

2. 研究の目的

成体における AM の赤血球分化に関わる機能を解析するために申請者らは条件付き AM 欠損マウス (AM Flox/Flox) マウスを作製した。本研究では、条件付き AM 欠損マウスを Mx-Cre トランスジェニック (Tg) マウスと交配して、pIpC 投与により適時に AM を欠損できるマウスを作製し、赤血球分化における AM の役割を解析する予定である。また、methyl transferase モチーフ配列および CXXC モチーフ配列を欠損する AM 変異体を含むレトロウイルスベクターを作製し、AM の作用機序を明らかにしていくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)条件付き AM 欠損マウスの解析

申請者らは Mx-Cre Tg マウスと AM Flox/Flox マウスを交配したマウス(Mx-Cre Tg-AMFlox・Flox マウス)を作製した。pIpC を投与し適時に AM を欠損させることができるこのマウスの表現型を詳細に解析することで、AM の機能を明らかにする。

(2)AM 変異体を組み込んだレトロウイルスベクターの作製と解析

AM の細胞内での検討をするため、すでに AM を組み込んだレトロウイルスベクターを作製している。本研究では、さらに methyl transferase モチーフ配列および CXXC モチーフ配列の役割を検討するため、同配列を欠損した AM 変異体 (deletion mutant:DM) を組み込んだレトロウイルスベクターを作製する。

(3) Mx-Cre・Tg-AM Flox・Flox マウス骨髄細胞を用いた移植実験

Mx-Cre Tg-AM Flox・Flox マウスに pIpC を投与することで AM を欠損させた骨髄細胞を採取し、放射線照射した野生型マウスに移植を行う。造血幹細胞としての再構築能の検討を行う他に、瀉血や抗がん剤投与、EPO 投与などを行い赤血球系統への影響を検討する。

(4) in vivo における AM の各モチーフ配列の意義の検討

(3)に上述した移植実験の際に、(2)で作製した各種レトロウイルスベクターを移植する骨髄細胞へ導入し、(3)で見られた影響が AM を含むレトロウイルスベクターでレスキューされるか確認を行うとともに、AM 変異体ベクターにおいて十分にレスキューされるか検討することで in

vivo における AM の各モチーフ配列の意義を検討する。

4. 研究成果

(1)条件付き AM 欠損マウスの解析

申請者らは AM Flox/Flox マウスと MX-Cre トランスジェニックマウスを交配させ成体マウスで pIpC 投与後に AM を欠損できるマウスを作製し、従来の AM KO マウスでは不可能であった成体赤血球分化における AM の役割解明を行った。pIpC 処理により骨髄・脾臓の赤血球系細胞の AM の発現の低下を確認した。処理後 3 週程度で AM を欠損させたマウスは致死となり、重度の貧血を呈することを見出した。AM 欠損処理によりコントロール群に比べ、骨髄や脾臓の細胞数は低下し前赤芽球分画の割合増加を認めた。また、AM 欠損処理をした骨髄細胞や赤芽球系細胞ではアポトーシスの亢進を認めた。上記のように申請者らは、AM の欠損は成体マウスの赤血球造血において前赤芽球以降の赤血球分化を阻害し、アポトーシスの亢進をきたすことで最終的に重度の貧血から致死となることを見出し、AM が成体赤血球造血においても重要な役割を占めていることを明らかにした。

(2)AM 変異体を組み込んだレトロウイルスベクターの作製と解析

作製したレトロウイルスベクターを用いて、AM と PICOT の結合に対し上記モチーフ配列の関与について検討を行ない、methyl-transferase モチーフ配列欠失により PICOT との結合が消失することを見出した。

(2)'鉄・硫黄クラスター形成タンパクにおける AM の機能解析

PICOT との結合が AM の細胞内での機能に重要な役割を占めていると考えられたため、鉄硫黄クラスター形成タンパクとしての機能について付随して分子細胞学的な解析を行った。

細胞内鉄制御において IRP1 は、鉄硫黄クラスターを保持しアコニターゼ活性を持ち、鉄欠乏時は IRE への結合能が増強し Tf 受容体の発現を誘導する。AM が鉄硫黄クラスターの生合成や細胞内鉄代謝、自由鉄の制御への関与を検討するため、AMKO マウスと WT のそれぞれの胎仔肝から培養細胞を作製した。その結果、AM 欠損株ではアコニターゼ活性が低下し、IRP1 の IRE への結合能の増強が認められず、Tf 受容体の誘導も認められなかった。また、細胞内の自由鉄は AM 欠損細胞では増加し、ROS の増加やアポトーシスの増加も見出した。これらのメカニズムに関与する因子を同定するためさらなる検討を行った。AM に結合する因子として以前当科では PICOT を見出していた。培養細胞に AM と PICOT を共発現する系では、酸化ストレスによる細胞内鉄過剰状態では結合が増強、逆に鉄欠乏状態にすると結合の減弱を見出した。

酵母において鉄硫黄クラスタータンパクである Dre2 に対し Tah18 が電子供与体として働くことが知られている。Dre2 のヒトホモログが AM であり、Tah18 のヒトホモログが Ndor1 である。以上の点から、鉄硫黄クラスターとして働く際に必要となる電子供与体として Ndor1 の可能性について着目し、AM との結合について分子細胞学的な検討を行った。培養細胞に AM と Ndor1 を共発現した系を作成し、酸化ストレスによる細胞内鉄過剰状態では結合が増強、逆に鉄欠乏状態にすると結合が減弱することを見出した。

以上から、AM と PICOT、Ndor1 が共同して鉄硫黄クラスター系として機能して赤血球分化に対し働いている可能性を示唆することができた。

(3) Mx-Cre・Tg-AM Flox・Flox マウス骨髄細胞を用いた移植実験

Mx-Cre Tg-AM Flox・Flox マウスに pIpC を投与することで AM を欠損させた骨髄細胞を採取し、放射線照射した野生型マウスに移植を行う。造血幹細胞としての再構築能の検討を行う他に、瀉血や抗がん剤投与、EPO 投与などを行い赤血球系統への影響を検討した。現時点ではまだ、明らかな結論は得られていないが、造血不全の傾向がみられており引き続き今後の解析が必要と考えられる。

(4)については明らかな結論は得られていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishibashi Tomohiko, Yokota Takafumi, Satoh Yusuke, Ichii Michiko, Sudo Takao, Doi Yukiko, Ueda Tomoaki, Nagate Yasuhiro, Hamanaka Yuri, Tanimura Akira, Ezoe Sachiko, Shibayama Hirohiko, Oritani Kenji, Kanakura Yuzuru	4. 巻 495
2. 論文標題 Identification of MS4A3 as a reliable marker for early myeloid differentiation in human hematopoiesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 2338 ~ 2343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibayama Hirohiko, Teshima Takanori, Choi Ilseung, Hatake Kiyohiko, Sekiguchi Naohiro, Yoshinari Nozomi	4. 巻 59
2. 論文標題 Phase I study of ibrutinib in Japanese patients with treatment-na?ve chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 179 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslrt.19023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷村 朗, 柴山浩彦
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第42回日本鉄バイオサイエンス学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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, 金倉譲
2. 発表標題 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における役割の解析
3. 学会等名 第79回日本血液学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	柴山 浩彦 (Shibayama Hirohiko) (60346202)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究 分担者	金倉 譲 (Kanakura Yuzuru) (20177489)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	平成30年度まで研究分担者として参画