

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（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591034

研究課題名（和文）Bリンパ球の生存・増殖における抗アポトーシス分子アナモルシンの役割の解析

研究課題名（英文）Analysis of the roles of anamorsin, anti-apoptotic molecule, on survival and proliferation of B lymphocytes

研究代表者 柴山 浩彦 (SHIBAYAMA HIROHIKO)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60346202

研究成果の概要（和文）：アナモルシン（AM）トランスジェニック（Tg）マウスの脾臓からBリンパ球（B）を単離し、LPS刺激したところ、AM Tg Bの方がWT Bよりも細胞の増殖能が減弱していた。さらに、LPSにて刺激した際のシグナル伝達分子の活性化をウェスタンブロッティングによって解析したところ、ERK1/2 および IκB のリン酸化の低下を認めた。また、AM Tg BとWT Bの遺伝子発現をDNAアレイにて比較したところ、AM Tg BにおいてIL-1βの発現の低下を認めた。以上より、過剰発現のAMがBにおけるLPS刺激のシグナル伝達経路に作用していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The proliferation of B lymphocytes (B) from anamorsin (AM) transgenic (Tg) mice by LPS was impaired compared with WT B. The Western blotting analysis showed the phosphorylation of ERK1/2 and IκB were reduced. Furthermore, the expression of IL-1β mRNA was decreased in AM Tg B by DNA array compared with WT B. From these data, it was clarified that AM overexpression had negative effects on LPS-induced signal pathways of B.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、Picot、鉄・硫黄クラスター、Bリンパ球、遺伝子改変マウス、LPS、ERK1/2、IκB

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既知の抗アポトーシス分子や細胞周期を制御する分子と相同性を示さない全く新規の分子である。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、細胞質に局在することがわかっている。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 の機能を抑制すると報告されており、アナモルシンも Picot とともに PKC θ の機能を修飾している可能性が示唆された。

アナモルシン分子と疾患との関わりについては、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 (DLBCL)、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強発現を認めた。さらに、アナモルシンの発現と臨床データとの比較をおこなったところ、DLBCL の一部の症例において、アナモルシンを強発現している場合、化学療法に対する反応性が悪くなり、生命予後が不良となることが明かとなった。

さらに我々は、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 リンパ球の割合の増加を認めた。アナモルシン KO マウスにおいては、脾臓の著明な萎縮がみられることを合わせ考えると、アナモルシンは B リンパ球の生存・増殖にも深く関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

B リンパ球の生存・増殖におけるアナモルシンの役割を解析することで、B 細胞性悪性リンパ腫のような腫瘍性疾患のみならず、自己免疫性疾患など、B リンパ球の異常が関係する非腫瘍性疾患の病態におけるアナモルシンの関与を明かにする。また、B リンパ球を研究対象として、B リンパ球内でのアナモルシンの機能を明かにすることで、いまだ完全には明らかになっていないアナモルシンの作用機序を解明する手がかりとする。

3. 研究の方法

アナモルシン Tg マウスの脾臓から B リンパ球を純化する。その B リンパ球を *in vitro*

および *in vivo* にて、LPS によって刺激し、野性型 (WT) マウスから得られた B リンパ球の生存・増殖と比較する。同時に、それらの細胞内でのシグナル伝達分子の発現パターンやリン酸化のパターンを比較する。さらに、アナモルシンと Picot との相互作用や、鉄・硫黄クラスター形成にも焦点をあてて解析する。

4. 研究成果

アナモルシン Tg マウスの脾臓から B リンパ球を単離し、*in vitro* で LPS 刺激したところ、予想に反し、アナモルシンを過剰発現している B リンパ球の方が、WT B リンパ球よりも細胞の増殖能が減弱していた。また、*in vivo* にて LPS を投与したところ、*in vitro* と同様に、アナモルシン Tg マウスの B リンパ球の増加反応が WT マウスと比較して減弱していた。その現象を詳細に解析するために、LPS にて刺激した際のシグナル伝達分子の活性化をウェスタンブロッティングによって解析したところ、アナモルシン Tg B リンパ球において、ERK1/2 および I κ B のリン酸化の低下を認め、LPS 刺激のシグナルが減弱していることが明らかとなった。また、アナモルシン Tg B リンパ球と WT B リンパ球の遺伝子発現を DNA アレイを用いて比較したところ、発現に差がある遺伝子群の中で LPS 刺激と関与する一つの分子として、アナモルシン Tg B リンパ球において、IL-1 β の発現の低下を認めた。この現象は、LPS 刺激時にも同様の反応がみられ、過剰発現しているアナモルシンが B リンパ球における LPS 刺激のシグナル伝達経路に作用していることが明らかとなった。

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 11 件)

- ① Yun N, Kim C, Cha H, Park WJ, Shibayama H, Park I-S, Oh YJ. Caspase-3-mediated cleavage of PICOT in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 432(3):533-538, 2013. 査読有
- ② Ogata K, Kakumoto K, Matsuda A, Tohyama K, Tamura H, Ueda Y, Kurokawa M, Takeuchi J, Shibayama H, Emi N, Motoji T, Miyazaki Y, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F. Differences in blast immunophenotypes among disease

- types in myelodysplastic syndromes: A multicenter validation study. *Leuk Res* 36(10):1229-1236, 2012. 査読有
- ③ 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(1):200-210, 2012. 査読有
- ④ Tomita N, Yokoyama M, Yamamoto W, Watanabe R, Shimazu Y, Masaki Y, Tsunoda S, Hashimoto C, Murayama K, Yano T, Okamoto R, Kikuchi A, Tamura K, Sato K, Sunami K, Shibayama H, Takimoto R, Oshima R, Hatta Y, Moriuchi Y, Kinoshita T, Yamamoto M, Numata A, Ishigatsubo Y, Takeuchi K. Central nervous system event in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer Sci* 103(2): 245-251, 2012. 査読有
- ⑤ Zaki M, Wada N, Ikeda J, Shibayama H, Hashimoto K, Yamagami T, Tatsumi Y, Tsukaguchi M, Morii E, Aozasa K. Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. *Virchows Archiv* 459(4):361-366, 2011. 査読有
- ⑥ Nakamae H, Shibayama H, Kurokawa M, Fukuda T, Nakaseko C, Kanda Y, Nagai T, Ohnishi K, Maeda M, Matsuda A, Amagasaki T, Yanada M, for the Japanese AMN107/2303 Study Group. Nilotinib as frontline therapy for patients with newly diagnosed Ph⁺ chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the Japanese subgroup of ENESTnd. *Int J Hematol* 93(5):624-632, 2011. 査読有
- ⑦ 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(2): 329-333, 2011. 査読有
- ⑧ 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(2): 303-307, 2011. 査読有
- ⑨ Park KA, Yun N, Shin DI, Choi SY, Kim H, Kim WK, Kanakura Y, Shibayama H, Oh YJ. Nuclear translocation of anamorsin during drug-induced dopaminergic neurodegeneration in culture and in rat brain. *J Neural Transm* 118(3): 433-444, 2011. 査読有
- ⑩ Kurosawa S, Yamaguchi T, Miyawaki S, Uchida N, Sakura T, Kanamori H, Usuki K, Yamashita T, Okoshi Y, Shibayama H, Nakamae H, Mawatari M, Hatanaka K, Sunami K, Shimoyama M, Fujishima N, Maeda Y, Miura I, Takaue Y, Fukuda T. Prognostic factors and outcomes of adult patients with acute myeloid leukemia after first relapse. *Haematologica* 95(11): 1857-1864, 2010. 査読有
- ⑪ Chihara T, Wada N, Kohara M, Matsui T, Masaya H, Maeda T, Shibayama H, Kanakura Y, Tani M, Morii E, Aozasa K. Peripheral T-cell lymphoma of Lennert type complicated by monoclonal proliferation of large B-cells. *Pathol*

Res Pract 206 (3): 185-190, 2010. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① 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)
- ② 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)
- ③ Hamanaka Y, Shibayama H, Tanimura A, Oritani K, Kanakura Y. Detection of change in LIC by MRI in a transfusion dependent MDS patient treated with deferasirox. 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 20, 京都)
- ④ Kohara T, Shibayama H, Uoshima N, Terada Y, Yoshida H, Masaie H, Ishikawa J, Mugitani A, Kumura T, Okamoto S, Kamitsuji Y, Sugahara H, Nakagawa M, Kawakami M, Ishiko J, Take H, Kosugi S, Nakata S, Nagate Y, Kida T, Tominaga N, Morita T, Inoue S, Yamada M, Wada N, Aozasa K, Kanakura Y, Hino M. Evaluation of efficacy and safety of Bendamustine (B) treatment in Osaka Lymphoma Study Group (OLSG). 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19, 京都)
- ⑤ 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)
- ⑥ Hochhaus A, Ossenkoppele G, Reiffers J, Yao M, Shibayama H, Gattermann N, Hughes TP, Saglio G, Larson RA, Hoenekepp A, Gallagher NJ, Yu R, Blakesley RE, Lobo C, Kantarjian HM. Results From the ENESTnd Extension Study: Efficacy and Safety of Patients (pts) with Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP), Treated with Nilotinib 400 Mg Twice Daily (BID) After Suboptimal Response (SoR) or Treatment Failure (TF) to Imatinib 400 Mg Once Daily (QD) or Nilotinib 300 Mg BID. The American Society of Hematology 53rd Annual meeting (2011. 12. 10, San Diego, USA)
- ⑦ 小原尚恵, 柴山浩彦, 武 弘典, 魚嶋伸彦, 服部英喜, 畦西恭彦, 菅原浩之, 橋本光司, 日野雅之, 富永信彦, 青笹克之, 金倉 讓, OLSG 参加施設. Clinical prognostic analysis of 465 follicular lymphoma (FL) cases from OLSG (Osaka Lymphoma Study Group) registry: OLSG cohort analysis. 第 73 回日本血液学会学術集会 (2011. 10. 14, 愛知)
- ⑧ Nakaseko C, Nakamae H, Shibayama H, Kurokawa M, Fukuda T, Kanda Y, Nagai T, Ohnishi K, Matsumura I, Matsuda A, Amagasaki T, Kojo N, Ito K. Nilotinib versus imatinib for newly-diagnosed CML-CP: ENESTnd 24-month update in Japanese patients. 第 73 回日本血液学会学術集会 (2011. 10. 14, 愛知)
- ⑨ 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)
- ⑩ 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. 15th Congress of the European Hematology Association (2010. 6. 10, Barcelona, Spain)
- ⑪ Saito Y, Shibayama H, Tanaka H, Tanimura A, Matsumura I, Kanakura Y. A cell-death-defying factor, anamorsin,

contributes cell growth through inactivation of p38MAPK. 15th Congress of the European Hematology Association (2010.6.10, Barcelona, Spain)

- ⑫ Shibayama H, Nakamae H, Kurokawa M, Fukuda T, Nakaseko C, Kanda Y, Ohnishi K, Matsuda A, Nagai T, Maeda Y, Amagasaki T, Kawahara E, Yanada M. Efficacy and safety of nilotinib versus imatinib in Japanese patients with newly diagnosed CML-CP. 第72回日本血液学会学術集会(2010.9.24, 横浜)
- ⑬ Tanimura A, Tanaka H, Saito Y, Shibayama H, Matsumura I, Kanakura Y. Anti-apoptotic molecule Anamorsin is crucial for stromal function to support embryonic hematopoiesis. 第72回日本血液学会学術集会(2010.9.24, 横浜)
- ⑭ 齋藤有里, 柴山浩彦, 田中宏和, 谷村朗, 松村 到, 金倉 讓. A cell-death-defying factor, anamorsin, yields cell growth through inactivation of p38MAPK (抗細胞死分子アナモルシンは、p38MAPK を不活化し細胞増殖をもたらす). 第69回日本癌学会学術総会(2010.9.22, 大阪)

[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

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

(2) 研究分担者

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

田中宏和(TANAKA HIROKAZU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40360846
(H22 まで分担者として参画)