

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25461449

研究課題名(和文) 免疫細胞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 anti-apoptotic molecule, Anamorsin in immune cells

## 研究代表者

柴山 浩彦 (SHIBAYAMA, Hirohiko)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60346202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Anamorsin (AM) 遺伝子改変マウス (AMトランスジェニックマウスおよびAMコンディショナルノックアウトマウス) を用いて、免疫細胞の中でも主としてBリンパ球におけるAMの機能を解析した。AMが過剰発現しているとRasの活性化が抑制され、Bリンパ球のLPSの刺激伝達が減弱することがわかった。また、Bリンパ球のAMが欠損すると、Bリンパ球の最終分化が抑制されることがわかった。以上より、AMはBリンパ球内のシグナル伝達に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have analyzed the functions of Anamorsin (AM), anti-apoptotic molecule, in the immune cells, especially in B lymphocytes by using gene-altered mice (both of AM transgenic mice and AM conditional knock-out mice). The overexpression of AM in B lymphocytes leads to inhibition of Ras activity and decrease of the signaling with LPS stimulation. The defect of AM in B lymphocytes leads to inhibition of B lymphocyte terminal differentiation. From these data, AM might play important roles on the signaling pathways in B lymphocytes.

研究分野：血液内科

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

## 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、 $\gamma$ -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)。

Anamorsin分子の遺伝子配列あるいはアミノ酸配列を用いた相同性の検索あるいはモチーフ検索を行ったところ、Anamorsin分子は、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ことが判明した。

我々は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。

また、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、リボゾーム生成、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)。我々も、Anamorsin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クラスター蛋白の機能を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ている。

次に我々は、Anamorsin過剰発現状態の生物学的意義を検討する目的にて、CAGプロモーターの下流にAnamorsin cDNAをつないだベクターを受精卵にトランスフェクションしたAnamorsinトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。そのマウスのBリンパ球機能を検討するためにマウス腹腔内にLPSを投与したところ、当初はWTマウスと比較してBリンパ球が過剰に増殖反応すると予想したが、結果は逆となり、WTマウスに比べLPSへの反応性が弱いことが判明した。

本研究においては、上記の研究を継続し、主にAnamorsin Tgマウスおよび新たに作製予定のAnamorsinコンディショナルKOマウスを用いて、主にAnamorsinのBリンパ球における役割を明らかにする。

## 2. 研究の目的

Anamorsinは、鉄・硫黄 (Fe-S) クラスタを形成する分子として、Bリンパ球、マクロファージなどの免疫細胞の機能に関与している可能性がある。また、Picotと結合し、細胞内のシグナル伝達分子の活性化に関与している可能性がある。本研究では、Anamorsin遺伝子改変マウス、主にAnamorsinトランスジェニックマウスと新たに作製する予定のAnamorsinコンディショナルKOマウスを用いて、免疫細胞の中でも特にBリンパ球のAnamorsinの機能および細胞内のシグナル伝達への役割を詳細に解析する。さらに、Fe負荷状態でのそれらの細胞の解析も合わせて行い、AnamorsinがFeのセンサーとして、免疫細胞の機能調節に関与していることを明らかにする。また、炎症状態における体内への鉄の吸収抑制・鉄利用障害にも

Anamorsinが関与している可能性があるので、それを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) Anamorsin TgマウスにLPSを投与した際の、Bリンパ球、Tリンパ球、マクロファージのサイトカイン産生能、細胞内のシグナル伝達分子のリン酸化の評価をおこなう。また、同様の実験を、それぞれの細胞を分離し、*in vitro*において、LPSを培養液中に添加することにより、直接的作用の評価を行う。

(2) AnamorsinがFe-Sクラスター形成に関係する分子であること、Fe-Sクラスター蛋白の1つであるIRP-1の発現量を調節し、細胞内へのFeの取り込みを制御していること、Anamorsin欠損細胞においては、細胞内に自由Feが多く存在し、さらにROSの蓄積が見られることから、Anamorsinは細胞内のFeの代謝に重要な役割を果たしていることが考えられる。Anamorsin TgマウスにFeを負荷し、細胞内のFeの状態に変化を認めるかどうかをBリンパ球の細胞内自由FeやROSの量を測定することと、Bリンパ球の機能を評価することで解析する。

(3) Anamorsinコンディショナル KOマウス (Anamorsin Flox/Floxマウス) を作製中であり、そのマウスが作製できれば、広くBリンパ球に発現しているCD19のプロモーターの下流にCreリコンビナーゼを発現しているCD19-Cre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を欠損させたマウスを作製する。そのマウスのBリンパ球の数や、免疫グロブリンの量などを測定することで、AnamorsinのBリンパ球における役割を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) Anamorsin Tgマウスの腹腔内にLPSを投与し、脾臓のBリンパ球数、Tリンパ球数の変化をみたところ、WTマウスと比較して両細胞とも有意に増殖が低下していた。このこ

とは、Bリンパ球を採取し *in vitro*でLPS刺激した際の細胞増殖も同様に、Anamorsin TgマウスのBリンパ球の培養液中での増殖が、WTマウスのBリンパ球と比較して低下していた。

次に、LPSがToll like receptor 4に結合したあとのシグナル伝達に関与するERK1/2とI Bのリン酸化を調べると、Anamorsin TgマウスのBリンパ球において、WTマウスのBリンパ球と比較して低下していた。さらに、AnamorsinのBリンパ球のシグナル伝達における作用点を解析する目的で、Anamorsin TgマウスとWTマウスの脾臓から単離したBリンパ球を *in vitro*でLPSによって刺激した際の細胞から抽出したmRNAを用いてDNAマイクロアレイをおこない、遺伝子の発現変化を比較し、変化している遺伝子群からその上流にある分子を解析したところ、Anamorsin Tgマウスにおいて、WTマウスと比較してRasの活性が低下していることが示唆された。実際に、Rasアッセイをおこなったところ、Anamorsin TgマウスのBリンパ球では、LPS刺激によるRasの活性化がWTマウスのBリンパ球と比較して低下していることが明らかとなった。Anamorsinは、サイトカインやLPS刺激によって、発現が誘導されることが知られており、また、サイトカイン刺激の場合は、Rasの経路を介しAnamorsinの発現が誘導されることも知られている。今回の研究によって、AnamorsinはBリンパ球におけるLPSの増殖シグナルに対しネガティブフィードバックに働いていることが示唆された。

(2) Anamorsin Tgマウスの腹腔内に鉄(Fe)を投与し、IL-1の産生などを比較したところ、LPSを投与した際と同様に、WTマウスと比較し、IL-1の産生が低下していた。このことは、過剰鉄によって誘導される炎症反応が、Anamorsinによって、抑制されている可能性が示唆されたこととなる。

AnamorsinはFe-Sクラスター形成に関係する分子であること、Fe-Sクラスター蛋白の1つであるIRP-1の発現量を調節し細胞内へのFeの取り込みを制御していること、Anamorsin欠損細胞においては、細胞内に自由Feが多く存在し、さらにROSの蓄積がみられることから、Anamorsinは細胞内のFeの代謝に重要な役割を果たしていることは示されているが、さらにin vivoにおけるFeのセンサーとしても機能している可能性が示された。

(3) AnamorsinコンディショナルKOマウスが作製できたため、CD19Cre Tgマウスと交配し、CD19陽性Bリンパ球のみAnamorsinを欠損させた遺伝子改変マウスを作製した。

そのマウスを解析するのに、末梢血、骨髓、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。

(4) 以上、Anamorsin TgマウスおよびCD19 Cre Tg/Anamorsin Flox/FloxマウスのBリンパ球を解析したところ、LPSからのシグナル、特に、BCR-BTKのシグナル伝達系にAnamorsinは作用していることが示唆された。

AnamorsinはFe-Sクラスター形成に重要な役割を果たすことが知られており、Fe-Sクラスター蛋白がBリンパ球におけるLPSおよび

BCR-BTKシグナル伝達系において影響していることが考えられた。具体的に、どのFe-Sクラスター蛋白が関わっているかは、今後明らかにしていく必要がある。

#### 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7件)

- (1) Jang JH, Harada H, Shibayama H, Shimazaki R, Kim H-J, Sawada K, Mitani K. A randomized controlled trial comparing darbepoetin alfa doses in red blood cell transfusion-dependent patients with low- or intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 102(4): 401-412, 2015. DOI: 10.1007/s12185-015-1862-5
- (2) Tanimura A, Shibayama H, Hamanaka Y, Fujita N, Ishibashi T, Sudo T, Yokota T, Ezo 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(5): 410-422, 2014. DOI: 10.1016/j.exphem.2014.01.002
- (3) 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 neuro- degeneration. *J Biol Chem* 289(32): 22183-22195, 2014. DOI: 10.1074/jbc.M114.552679

[学会発表](計14件)

- (1) Tanimura A, Shibayama H, Hamanaka Y, Fujita N, Nagate Y, Ishibashi T, Ichii M, Yokota T, Ezo 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)

- (2) 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)
- (3) 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)
- (4) 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)
- (5) 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)

〔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](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・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：60346202

### (2) 研究分担者

金倉讓 (KANAKURA, Yuzuru)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20177489

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