

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461401

研究課題名(和文) 生体内鉄代謝制御におけるアナモルシンの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Anamorsin in iron metabolism in vivo

研究代表者

濱中 有理 (HAMANAKA, Yuri)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50722287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アナモルシン(Anamorsin, AM)の細胞内鉄代謝への関与の報告はあるが、生体内鉄代謝への関与は不明である。Cre-loxP systemを用いたAM遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを作製し、AMの生体内鉄代謝における機能解析のため、Alb-Cre Tgマウスと交配し、肝臓特異的AM欠損マウスを作製したところ、肝臓の組織像で、肝細胞の核の肥大化と、一部の細胞に核内封入体を認めた。細胞質には何らかの物質(特定はできていない)の蓄積像を認め、AMが何らかの物質の代謝に関与している可能性が示唆された。物質としては、グリコーゲンや鉄などの可能性を疑っており、今後、明らかにする予定である。

研究成果の概要(英文)：Anamorsin (AM) has been reported to be involved in intracellular iron metabolism, however, its involvement in iron metabolism in vivo is still unknown. Because AM-deficient mice are embryonic lethal, it is difficult to analyze the functions of AM in adult mice. To overcome the embryonic lethality of AM-deficient mice, AM conditional knockout mice using Cre-loxP system were generated and crossed with Alb-Cre Tg mice to generate hepatocyte specific AM-deficient mice (Alb-Cre, AM Flox/Flox mice). In the liver cells of the Alb-Cre, AM Flox/Flox mice, enlargement of the nucleus of hepatocytes and nuclear inclusion bodies in some hepatocytes were observed. The accumulation of some substances (not specified yet) in the cytoplasm was also observed, which suggested that AM might have some roles in some substances metabolism. Considering the possibility of being glycogen or iron, we will clarify the substances in the future study.

研究分野：鉄代謝

キーワード：アナモルシン 鉄代謝 アナモルシン コンディショナルノックアウトマウス アルブミンCreトランスジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

アナモルシン (Anamorsin, AM) は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 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 $\epsilon$  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 と結合し、PKC 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) クラスター形成に必須の分子であることが報告され (Mol Cell Biol 28:5569, 2008)、我々も 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 クラスター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。

また、AM トランスジェニックマウスを用いて AM の機能を解析する研究をおこなったところ、AM を過剰に発現する B リンパ球では、炎症に関連する遺伝子発現が低下していることが判明した。生体レベルで鉄を過剰に投与すると、炎症が惹起される現象が観察できるが、AM トランスジェニックマウスにおいては、その反応が減弱していることが明らかとなった。

これらの結果から、AM は抗アポトーシス作用、細胞増殖作用などの当初見出した機能に加えて、細胞内の鉄代謝に関与しているのみではなく、生体レベルでの鉄の動態調節に関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

我々は AM が、AM の yeast ホモログである Dre2 と同様に鉄硫黄 (Fe-S) クラスター形成に関与することを明らかにし、また、Fe-S クラスター形成のみではなく、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作製し、ヘプシジンの産生など、肝臓が生体内の鉄代謝において重要な役割を担っていることから、肝細胞の AM を特異的に欠損させることで、生体レベルでの鉄の動態調節機構における AM の役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 肝臓特異的 AM 欠損マウスの作製

本研究では、AM コンディショナルノックアウトマウスと肝臓特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを交配し、肝細胞の AM を欠損させることで、生体マ

ウスにおける肝臓での AM の機能を明らかにする。特に、これらの遺伝子改変マウスを解析することで、生体での鉄の動態調節機構に対する AM の役割を解明する。AM 遺伝子の通常のノックアウトマウスは胎生致死であり、これまで、成体マウスを用いた in vivo における AM の機能解析が不可能であった。Cre-loxP system を用いた AM のコンディショナルノックアウトマウス (AM loxP KO マウス) を作製し、肝臓の臓器に特異的なプロモーターの下流に Cre recombinase を発現させたトランスジェニックマウス (Alb-Cre Tg マウス) と AM loxP KO マウスを交配することで、肝細胞特異的に AM を欠損させたマウス (Alb-Cre Tg-AM loxP KO マウス) を作製した。

(2) Alb-Cre Tg-AM loxP KO マウス (肝臓特異的 AM 欠損マウス) の解析

Alb-Cre Tg-AM loxP KO マウスを用いて、肝臓の形態・機能に対する AM がおよぼす影響を病理組織学的、生理学的に検討した。

#### 4 . 研究成果

(1) AM 欠損マウスは胎生致死であるため、KO マウスの成体での解析は不可能である。そこで、Cre-loxP system を用いた AM 遺伝子コンディショナルノックアウトマウス (AM loxP KO マウス) を作製した。AM loxP KO マウスを Alb-Cre Tg マウスと交配し、肝臓特異的 AM 欠損マウス (Alb-Cre/AM loxP KO マウス) を作製した。肝細胞のウエスタンブロッティングにより AM の欠損を確認した。

(2) Alb-Cre/AM loxP KO マウスは、メンデル比通りに生まれ、少なくとも 6 ヶ月は生存している。生後 3 ヶ月目、6 ヶ月目に肝臓機能を評価するため、肝逸脱酵素、胆道系酵素など測定したが、コントロールマウスと差を認めなかった。次に解剖をおこない、肝臓の組織像を評価したところ、3 ヶ月目では目立たな

かったが、6 ヶ月目には AM 欠損マウスにおいて肝細胞の核の肥大化と、一部の細胞に核内封入体が認められた。また、細胞質の染色性もコントロールマウスと異なっており、細胞質に何かの物質の蓄積がある可能性が示唆された。グリコーゲンや鉄である可能性を考え、特殊染色をおこなったが、それらは否定的であった。さらに検討をすすめ、何なのかを明らかにしていく予定である。今後は、月齢が 6 ヶ月以上のマウスの肝臓を検討するとともに、肝細胞を用いて RNAseq をおこなうことで、AM 欠損による遺伝子発現の変化を調べる。さらに、このマウスに鉄を負荷し、鉄代謝への影響を調べる予定である。現在、腹腔内に鉄を過剰投与し、肝臓におけるヘプシジンの産生能に対する AM の影響や、鉄負荷時の炎症反応への影響を検討している。また、腹腔内に LPS を投与することで、炎症モデルを作製し、その際の肝臓でのヘプシジン産生能に対する AM の影響を検討する。

#### 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 2 件)

Anamorsin, a novel caspase-3 substrate in neurodegeneration.

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.

J Biol Chem. 2014 Aug 8;289(32):22183-22195. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M114.552679. Epub 2014 Jun 27.

The anti-apoptotic gene Anamorsin is essential for both autonomous and extrinsic regulation of murine fetal liver hematopoiesis.

Tanimura A, Shibayama H, Hamanaka Y, Fujita N, Ishibashi T, Sudo T, Yokota T, Ezoe S,

Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kanakura Y.

Exp Hematol. 2014 May;42(5):410-422.e4.  
査読有 doi: 10.1016/j.exphem.2014.01.002.  
Epub 2014 Jan 16.

〔学会発表〕(計 9件)

第78回日本血液学会学術集会

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

アナモルシンはB細胞分化において重要な役割をはたしている

2016.10.13-15 (発表日 10.14), パシフィコ横浜, 横浜

European Hematology Association 21st congress

Y. HAMANAKA, H. SHIBAYAMA, A. TANIMURA, T. YOKOTA, S. EZOE, M. ICHII, T. ISHIBASHI, Y. DOI, Y. NAGATE, K. ORITANI, Y. KANAKURA.  
ANAMORSIN IS ESSENTIAL FOR B-CELL TERMINAL DIFFERENTIATION

2016.6.9-12 (発表日 6.11), Bella Center, Copenhagen, Denmark

第6回 JSH International Symposium 2015

Akira Tanimura, Hirohiko Shibayama, Yuri Hamanaka, Natsuko Fujita, Yasuhiro Nagate, Tomohiko Ishibashi, Michiko Ichii, Takafumi Yokota, Sachiko Ezoe, Kenji Oritani, Yuzuru Kanakura

(発表日 5.23) (ポスター) An Anti-Apoptotic Molecule, Anamorsin, Is Upregulated in Anemia and Essential for Imperative Erythropoiesis.

2015.5.22-23, 軽井沢プリンスホテル, 長野

The American Society of Hematology 56th Annual Meeting

Y. HAMANAKA, H. SHIBAYAMA, A. TANIMURA, T.

YOKOTA, S. EZOE, M. ICHII, N.SAITO, K.MATSUI, T.SUDO, T. ISHIBASHI, Y. DOI, Y. NAGATE, M.TAKEMOTO, K. ORITANI, Y. KANAKURA.

(発表日 12.8)(Poster) Anamorsin Overexpression Leads to Dysregulation of Lipopolysaccharide-Stimulated B Cell Proliferation through Ras Signaling  
2014.12.06-09. Moscone Center, San Francisco, USA

The American Society of Hematology 56th Annual Meeting

A. TANIMURA, H. SHIBAYAMA, Y. HAMANAKA, N.FUJITA, Y.NAGATE, T. ISHIBASHI, N.SAITOH, M. ICHII, T. YOKOTA, S. EZOE, K. ORITANI, Y. KANAKURA.

(発表日 12.8)(Poster) An Anti-Apoptotic Molecule, Anamorsin, is Upregulated in Anemia and Essential for Imperative Erythropoiesis.

2014.12.06-09. Moscone Center, San Francisco, USA

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

濱中 有理 (HAMANAKA, Yuri)  
大阪大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 50722287

### (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

金倉 譲 (KANAKURA, Yuzuru)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20177489