The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification of a cytokine-induced anti-apoptotic molecule Anamorsin essential for definitive hematopoiesis
Author(s)	高井, 恵美
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45367
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【59】

氏　　名	高井恵美（たかいえみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　18487　号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Identification of a cytokine-induced anti-apoptotic molecule Anamorsin essential for definitive hematopoiesis **（サイトカインにより誘導される造血に必須な抗アポトーシス分子アナモルシンの同定）**
論文審査委員	（主査） 教　授　金倉　譲 （副査） 教　授　長田　重一　　教　授　辻本　賀英

論文内容の要旨

[目的]

多くの造血因子やサイトカインは、細胞をアポトーシスから回避させることが知られているが、その抗アポトーシス機序の全容は完全には明らかとなっていない。そこで、サイトカイン非依存性増殖をするマウス造血細胞株を新たに樹立し、その細胞株から作成したcDNAライブラリーより新規の抗アポトーシス分子の同定を試みた。さらに、単離された分子についてはgene targeting法を用いて遺伝子欠損マウスを作成し、単離遺伝子のin vivoにおける機能解析を行い、サイトカインによる抗アポトーシス機構を検討した。

[方法と成績]

IL-3依存性マウス細胞株Ba/F3よりIL-3非依存性亜株を樹立し、cDNAライブラリーを作製した。このcDNAライブラリーから発現クローニング法により、抗アポトーシス活性をもつ遺伝子をクローニングし、Anamorsin（AM）と命名した。AMを強制発現したBa/F3は、IL-3除去により誘導されるアポトーシスに抵抗性を示した。AM cDNAは930 bpから成り、約37 kDaの蛋白をコードしていた。マウスAMは8番染色体に存在し、ヒトAMは16番染色体に存在する新規遺伝子であった。また、その配列から、AMはBc1-2などの既知のアポトーシス関連分子とは全く相同性を示さない分子であった。AMは胎児期および成体の種々の臓器に発現がみられ、またIL-3を含む種々のサイトカイン刺激によりその発現が誘導された。さらに、各種変異Rasを導入した細胞を用いた解析から、AMはRasを介したシグナルにより発現が誘導されることが明らかとなった。以上より、AMはRasシグナル下流にある抗アポトーシス分子であり、サイトカインによる生存に重要な役割を果たしていることが示された。

次に、*in vivo*のAMの機能を検討するためgene targeting法を用いてAM欠損マウスを作成した。AM遺伝子の第1エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲッティングベクターを構築し、エレクトロポレーションにてマウスES細胞株に導入した。PCR法とサザンブロッティング法にて相同組み換え体を選別し、正常ブラストシストにインジェクションしキメラマウスを作成後、交配を進め、AMヘテロ欠損（$AM^{+/-}$）マウスおよびAM欠損（$AM^{-/-}$）マウスを作成した。

$AM^{+/-}$ マウスは野生型マウスと表現型において差を認めなかったが、$AM^{-/-}$ マウスは胎生 14.5 日以降に胎生致死となった。$AM^{-/-}$ マウスは、外見上の目立った形態異常は認められなかったが、野生型マウスおよび $AM^{+/-}$ マウスと比較して身体が有意に小さく、著明な貧血と、肝臓・脾臓の萎縮が認められた。一次造血の障害は認められなかったが、二次造血の主たる臓器である胎児肝臓において、造血前駆細胞の絶対数は変わらなかったが、分化・成熟した赤芽球が減少していた。また、Tunel 染色および Annexin V染色の結果より、$AM^{-/-}$ マウス胎児肝の赤芽球系細胞のアポトーシスの亢進を認めた。さらに、$AM^{-/-}$ マウス胎児肝の細胞を用いた *in vitro* コロニーアッセイでは、サイトカインによるコロニー形成能が著明に低下し、特に赤血球系コロニーは全く形成されなかった。以上の結果より、$AM^{-/-}$ マウスでは、胎児肝の造血細胞のアポトーシス亢進と分化障害により、二次造血が障害されることが明らかとなった。さらに、$AM^{-/-}$ マウスおよび野生型マウスの胎児肝から得た mRNA を用いた DNA マイクロアレイの結果では、$AM^{-/-}$ マウス胎児肝において、アポトーシス関連分子の中で、Jak2 および Bc1-xL の発現量の低下が認められた。

[総括]

本研究では新規の抗アポトーシス分子 AM を同定した。AM は種々のサイトカイン刺激により Ras の経路を介して、その発現が誘導され、サイトカイン除去によるアポトーシスに対して、抵抗性を示した。また、AM 遺伝子欠損マウスは、胎児肝での二次造血に異常をきたし、胎生後期に致死となることにより、造血に必須の分子であることが明らかとなった。さらに、AM による抗アポトーシス作用には、Jak2 および Bc1-xL の関与が示唆された。

論文審査の結果の要旨

造血細胞の増殖、生存、分化の調節機構は複雑であり、転写因子、細胞周期制御因子、増殖因子、シグナル伝達分子、アポトーシス関連分子など、多岐にわたる分子のネットワークにより精巧に調節されている。その中で、造血因子やサイトカインは重要な役割を担っていることが知られており、その機構については in vitro の実験や、各種遺伝子欠損マウスやトランスジェニックマウス等の解析によりさらに重要な知見が得られてきているが、その全容はまだ明らかとはなっていない。

本研究では多種のサイトカイン刺激により共通して発現が誘導され、Ras のシグナル経路を介してその発現が調節される新規の抗アポトーシス分子「アナモルシン」を単離、同定し、さらに単離された分子の遺伝子欠損マウスを作成した。その結果、アナモルシン遺伝子欠損マウスは妊娠後期に胎生致死となり、マウス発生過程における胎児肝臓での２次造血が障害されていた。さらに、多系統にわたる造血コロニー形成能の低下と、特に、赤芽球の分化、成熟障害と、アポトーシスの亢進が認められ、アナモルシンは、造血に必須の分子であることが示された。よって本研究は、造血制御分子機構のさらなる解明につながる重要な研究であり、学位に値するものと思われる。