

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19545

研究課題名(和文)造血器腫瘍におけるKAP1チロシンリン酸化の機能解析

研究課題名(英文) Roles of tyrosine phosphorylation of KAP1 in leukemogenesis

研究代表者

久保田 翔 (Kubota, Sho)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別研究員 (PD・RPD)

研究者番号：70747831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：白血病原因遺伝子であるBCR-ABL チロシンキナーゼの活性化型変異体は主に細胞質に局在し、過剰なシグナル伝達を介して造血器腫瘍の発症を促進する。BCR-ABL を含むチロシンキナーゼは実際には核内にも移行することが知られているが、核内におけるチロシンリン酸化シグナル伝達の役割は明らかでない。BCR-ABLトランスジェニックマウスとエピジェネティクスレギュレーターKAP1をノックアウトマウスと交配した。これらのマウスを用いてKAP1のチロシンリン酸化のin vivoにおける正常造血および白血病発症での機能解析を行なった。分子メカニズムの解析ではK562細胞を用いて解析を行なった。

研究成果の概要(英文)：BCR-ABL, which is a highly activated oncogenic fusion tyrosine kinase in chronic myelogenous leukemia (CML) and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia (Ph+ ALL). Although it is well known that tyrosine phosphorylation is important for signal transduction in cytoplasm, roles of nuclear tyrosine phosphorylation in nuclear events is poorly understood. We generated a new BCR-ABL knock-in mice model, and we mated mice with conditional KAP1 knockout mice. Using these mice model, we analyzed the function of tyrosine phosphorylation of KAP1 in normal hematopoiesis and leukemogenesis. Analysis for molecular mechanism of tyrosine phosphorylation of KAP1 was performed in K562 CML cell line.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：BCR-ABL CML KAP1 TIF1beta エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

チロシンリン酸化によるシグナル伝達は、細胞質での機能が主に知られている (Hunter, T. Curr. Opin. Cell Biol., 2009)。しかし、核内におけるチロシンリン酸化シグナル伝達はあまり研究がなされていない。申請者は核内におけるチロシンリン酸化基質の一つとして Krab-associated protein 1 (KAP1/TIF1beta/TRIM28) を同定した (Kubota et al., 2013)。

KAP1 はヘテロクロマチンプロテイン 1 (HP1) とクロマチン上で結合し、クロマチン構造や転写の制御を行なっている (Schults et al., Genes. Dev., 2002)。申請者は、KAP1 のチロシンリン酸化が HP1 のクロマチンとの結合を阻害することを見出した。また、KAP1 のチロシンリン酸化は Ser-473 のリン酸化を促進し、転写抑制を解除することを報告した (Kubota et al., 2013)。

Bcr-Abl や JAK2-V617F などのチロシンキナーゼの活性型変異体による過剰なシグナル伝達は、造血器腫瘍の発症を引き起こす (Hunter T., 2009, James et al., Nature, 2005)。近年では、JAK2-V617F による核内チロシンリン酸化シグナルが HP1 のクロマチンとの結合を阻害し、造血器腫瘍の発症に関わることが報告され (Dawson et al., Nature, 2009)、核内チロシンリン酸化によるクロマチン構造制御と造血器腫瘍との関連が注目されつつある。

2. 研究の目的

(1) KAP1 チロシンリン酸化の正常造血細胞における機能解析

正常造血における KAP1 のチロシンリン酸化の役割を解明するために、本研究課題において、Kap1flox/flox;Cre-ERT(conditional KO)マウスを用いる。Kap1cKO マウスから CD150+CD34-Lin-Sca1+c-Kit+(LSK)造血幹細胞を採取する。Kap1cKO 造血幹細胞に野生型

の KAP1 または、KAP1-3YF 変異体をレトロウイルスを用いて導入した後、造血幹細胞の増殖活性および血球分化能を *in vitro* また *in vivo* にて解析する。この KAP1-3YF 変異体導入造血細胞においては、生理的な KAP1 のチロシンリン酸化が阻害されることで、HP1 のクロマチン結合が遷延をして標的遺伝子群が恒常的に抑制されるとともに、赤血球を始めとした成熟細胞の分化能が障害されることが予想される。さらに KAP1-3YF 変異体導入造血幹細胞および分化細胞の遺伝子発現解析により、KAP1 チロシンリン酸化を介して細胞分画・状況特異的に制御される標的遺伝子群を同定する。

(2) KAP1 チロシンリン酸化による造血器腫瘍発症の分子基盤の解明

BCR-ABL 陽性白血病細胞においては、核内の異常なリン酸化シグナルによって KAP1 が恒常的にチロシンリン酸化され、癌遺伝子の発現上昇とともに白血病の発症および増殖活性が亢進すると推察された。従って、KAP1-3YF 変異体を造血器腫瘍細胞に発現させることによって、標的である癌遺伝子の転写抑制が期待される。始めに、BCR-ABL 陽性慢性骨髄性白血病細胞株 K562 細胞において、KAP1 のチロシンリン酸化に伴う HP1 のクロマチン結合阻害・遺伝子発現制御などについて解析する。また、野生型 KAP1 または KAP1-3YF 変異体を K562 細胞に強制発現することで、KAP1-3YF による細胞増殖抑制効果を確認する。さらに、白血病細胞の増殖抑制効果に関与する遺伝子の発現を遺伝子発現解析によって検証する。必要に応じて標的遺伝子の過剰発現実験を行う。次に、生体内での KAP1 チロシンリン酸化の役割を明らかにするために、慢性骨髄性白血病モデルマウスである BCR-ABL1 トランスジェニック (TG)マウスと Kap1cKO マウスを交配した後、KAP1 の白血病細胞増殖抑制効果を検証、ま

た白血病幹細胞分画の遺伝子発現解析を行い、造血器腫瘍の発症過程における KAP1 チロシンリン酸化の分子基盤を解明する。

3. 研究の方法

(1) 正常造血細胞における KAP1 チロシンリン酸化の機能解析

Kap1cKO マウスの造血幹細胞に、野生型 KAP1 または KAP1-3YF 変異体をレトロウイルスを用いて導入する。遺伝子導入した造血幹細胞を致死量放射線照射したレシピエントマウスに移植し、造血幹細胞の増殖活性および血球分化能を *in vitro* および *in vivo* にて解析する。また、遺伝子発現解析によって KAP1 チロシンリン酸化を介して転写制御される遺伝子群を特定する。

(2) KAP1 チロシンリン酸化を介した造血器腫瘍発症の分子基盤の解明

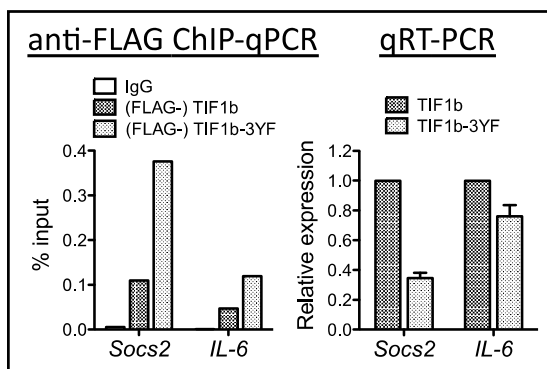
造血器腫瘍の発症過程における KAP1 チロシンリン酸化の役割を解明するため、BCR-ABL1 TG;Kap1-cKO マウスから採取した造血幹/前駆細胞に野生型 KAP1 または KAP1-3YF 変異体を導入後、レシピエントマウスに移植する。KAP1-3YF 変異体白血病細胞の表現形解析・遺伝子発現解析を行う。生化学的な解析には、KAP1-3YF 変異体を導入した BCR-ABL 陽性 K562 白血病細胞株も併せて用いる。

4. 研究成果

(1) 正常造血における機能解析のために、野生型および Kap1cKO マウスの造血幹細胞を採取した。採取した野生型および Kap1cKO 造血幹細胞に野生型の KAP1 または、KAP1-3YF 変異体をレトロウイルスを用いて導入した後、造血幹細胞の増殖活性および血球分化能を *in vitro* また *in vivo* にて解析する。レトロウイルスは細胞表面マーカーとして NGFR が発現するようにコンストラクションしてあ

るため n、NGFR をマーカーとして発現細胞の解析を行なった。予想通りノックアウトでは末梢血でのキメリズムが徐々に減少し、一年後にはほぼ消失することが確認された。また、骨髄細胞での解析も行なったところ造血幹細胞の数も顕著に減少する様子がみられた。レトロウイルスによる発現によって KAP1 の野生型を発現させると末梢血でのキメリズムおよび造血幹細胞数はレスキューされたが、リン酸化変異体では 2 次移植の際に造血幹細胞能の減少がみられた。このことから、KAP1 のチロシンリン酸化は造血幹細胞機能維持に必要だと考えられる。

(2) 白血病における KAP1 のチロシンリン酸化の制御機構の分子メカニズムの解析のため



めに、白血病細胞株 K562 細胞において KAP1 をノックダウンした後に、KAP1 の野生型および KAP1-3YF 変異体のレスキュー発現した細胞株を作製した。この細胞株において ChIP-qPCR による解析を行なったところ、KAP1 の野生型に比べて対象遺伝子の遺伝子領域に強く結合していることがわかった。これは以前の申請者が報告した内容と一致する。これらの遺伝子では野生型のレスキューセルラインに比較して発現の減少が見られたことから、KAP1 のリン酸化変異体では白血病細胞において転写制御活性があることが示唆された(上図)。

(3) 白血病における KAP1 のチロシンリン酸化の解析のために、BCR-ABL 誘導発現マウス

を用いて解析を行なった。BCR-ABL を誘導すると誘導後一ヶ月以内にマウスは B cell leukemia または CML を発症して死亡する。BCR-ABL 発現マウスと KAP1 のコンディショナルノックアウトマウスを交配して、BCR-ABL を発現しつつ KAP1 がノックアウトされるマウスを作製した。BCR-ABL 誘導発現マウスと BCR-ABL 誘導発現に加えて KAP1 がノックアウトされるマウスの骨髓細胞を致死量放射線照射したマウスに移植し、白血病の発症を比較した。KAP1 のノックアウトマウスと掛け合わせたマウスではマウスの生存が有意に延長した。ノックアウトしないマウスでは一ヶ月以内にほぼ全滅するが、一部のマウスでは半年間の観察でも CML の発症が起こらなかった。このことから KAP1 は BCR-ABL による白血病の発症に大きく関わっていることがわかった。KAP1 をターゲットとした創薬が BCR-ABL 陽性白血病の治療になりうる可能性が示唆された。

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4件)(国際論文・査読あり)

1. Src Acts as an Effector for Ku70-dependent Suppression of Apoptosis through Phosphorylation of Ku70 at Tyr-530. Morii M, Kubota S, Honda T, Yuki R, Morinaga T, Kuga T, Tomonaga T, Yamaguchi N, Yamaguchi N J Biol Chem. 2017 Feb 3;292(5):1648-1665. doi: 10.1074/jbc.M116.753202.
2. c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of JunB is required for Adriamycin-induced expression of p21. Yamaguchi N, Yuki R, Kubota S, Aoyama K, Kuga T, Hashimoto Y, Tomonaga T, Yamaguchi N. Biochem J. 2015 Oct 1;471(1):67-77. doi: 10.1042/BJ20150372.

3. Imatinib inhibits inactivation of the ATM/ATR signaling pathway and recovery from adriamycin/doxorubicin-induced DNA damage checkpoint arrest. Morii M, Fukumoto Y, Kubota S, Yamaguchi N, Nakayama Y, Yamaguchi N. Cell Biol Int. 2015 Aug;39(8):923-32. doi: 10.1002/cbin.10460.

4. Role for Tyrosine Phosphorylation of A-kinase Anchoring Protein 8 (AKAP8) in Its Dissociation from Chromatin and the Nuclear Matrix. Kubota S, Morii M, Yuki R, Yamaguchi N, Yamaguchi H, Aoyama K, Kuga T, Tomonaga T, Yamaguchi N. J Biol Chem. 2015 Apr 24;290(17):10891-904. doi: 10.1074/jbc.M115.643882.

[学会発表](計3件)

1. RUNX2 super enhancer promotes the development of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm

Sho Kubota(口頭発表)(STEP採択), Kenji Tokunaga, Motohiko Oshima, Tomohiro Umezu, Akinori Kanai, Kar Ton Tan, Henry Yang, Eisaku Iwanaga, Norio Asou, Takahiro Maeda, Atsushi Iwama, Kazuma Ohyashiki, Motomi Osato, and Goro Sashida

第79回日本血液学会学術集会, 2017.10.20-22, 東京国際フォーラム

2. RUNX2 promotes the pathogenesis of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm

Sho Kubota (ポスター発表) (BEST-POSTER-AWARD), Kenji Tokunaga, Eisaku Iwanaga, Kazuma Ohyashiki, Motohiko Ohshima, Atsushi Iwama, Takahiro Maeda, Motomi Osato, Goro Sashida

2nd Kumamoto IRCMS international symposium, 2016.10.31-2016.11.2, 熊本県民交流会館

3. がん遺伝子 v-Src による細胞周期進行抑制の分子機構.

本田拓也, 鈴木 亘, 森井真理子, 添田修平, 阿部紘平, 山口千尋, 久保田 翔, 青山和正,

中山祐治, 山口憲孝, 山口直人.
第 137 回日本薬学会年会, 2017.3.25-3.27, 仙
台国際センター

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kumamoto-ircms-sashida.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 翔 (Kubota Sho)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別研究
員(PD)

研究者番号: 70747831

(2) 研究分担者

特になし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

特になし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者

指田吾郎 (Sashida Goro)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘
教授

研究者番号: 70349447