

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15227

研究課題名(和文) Pseudokinase Trib1によるAMLのエピゲノム修飾

研究課題名(英文) Trib1 functions as a critical epigenetic regulator in AML

研究代表者

芳野 聖子 (Yoshino, Seiko)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 発がん研究部・研究員

研究者番号：40793617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病(AML)の発症と進展において、ホメオボックス遺伝子Hoxa9とCCAAT/enhancer-binding protein-1(C/EBP $\beta$ )は重要な転写因子であるが、Pseudokinase Trib1はその双方の機能を修飾することで更なる悪性化をもたらす。本研究では、Trib1がC/EBP $\beta$  p42の分解を介して、Hoxa9のDNA結合領域やスーパーエンハンサーを改変することを見出した。また、Trib1/Hoxa9の標的遺伝子としてErgを同定し、BRD4阻害剤JQ1は、*in vitro*及び*in vivo*の両方でTrib1/Erg依存的に増殖抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Trib1は、野生型の骨髄幹/前駆細胞での過剰発現だけで細胞の不死化と*in vivo*での白血病誘導能を示す数少ない白血病原因遺伝子である。本研究は、Trib1を軸として、これまで繋がりが見えなかったHoxa9とC/EBP $\beta$ のクロストークを明らかにした。さらに、本研究で同定した、Trib1/Hoxa9標的遺伝子が、新たな治療標的やバイオマーカーの発見に結びつくことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The pseudokinase Trib1 functions as a myeloid oncogene that recruits the ubiquitin ligase COP1 to C/EBP $\beta$  and interacts with MEK1 to enhance ERK phosphorylation. Close genetic interaction between Trib1 and Hoxa9 have been observed in myeloid leukemogenesis. Herein, we provide evidence that Trib1 modulates Hoxa9-associated super-enhancers. ChIP-seq analysis identified increased H3K27Ac signals at super-enhancers of the Erg, Spns2, Rgl1, and Pik3cd loci, as well as increased mRNA expression. Modification of super-enhancer activity was mostly achieved via p42-specific degradation of C/EBP $\beta$  by Trib1. Silencing of Erg abrogated the growth advantage acquired by Trib1 overexpression, indicating that Erg is a critical downstream target. Moreover, treatment with a BRD4 inhibitor JQ1 showed growth inhibition in a Trib1/Erg-dependent manner both *in vitro* and *in vivo*. Collectively, our study demonstrates a novel mechanism of Trib1 in modulations of chromatin and Hoxa9-driven transcription.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Trib1 Hoxa9 C/EBP ChIP-seq 白血病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト急性骨髄性白血病(AML)の発症と悪性化において、発がん性転写因子は大きな役割を担っている。中でも Hoxa9 と C/EBP は、原因遺伝子や予後不良因子として極めて重要である。例えば Hoxa9 は、正常核型で NPM1 遺伝子変異が見られるグループのほぼ全例で高発現し、第 11 染色体転座を有する MLL 関連 AML では MLL 融合遺伝子の直接の標的になり、Hoxa9 高発現は AML の不良な予後と強く相関し、t(7;11)転座で NUP98 と融合し AML 原因遺伝子となっている。また、C/EBP は好中球分化誘導能と強力な細胞周期抑制能を持ち、機能欠失型変異が AML の約 10% で認められる(Porse et al. Cell, 107:2, 2001)。以上の AML 臨床例の状況を踏まえると、Hoxa9 と C/EBP 双方の機能を修飾する AML 原因遺伝子 Trib1 の存在が脚光を浴びる。

Pseudokinase Trib1 は、AML 原因遺伝子かつ Hoxa9 協調遺伝子として、研究代表者の所属研究室で同定された (Jin et al. Blood, 109:3998, 2007)。Trib1 による白血病誘導の分子機構として、MEK1 との結合による ERK シグナルの亢進と遷延化と、C/EBP に対する分解誘導が挙げられる (Yokoyama et al. Blood, 116:2768, 2010)。すなわち、Trib1 の強力な発がん活性は、シグナル伝達及び転写調節系に同時に異常を付与することにある。一方で、Trib1 と Hoxa9 との協調作用の本態は依然不明である。

### 2. 研究の目的

近年、AML において Hoxa9 と C/EBP のゲノム上における DNA 結合部位がしばしば共存していることが報告された(Collins et al. PNAS, 111:27, 2014)。本研究では、Trib1 による Hoxa9 と C/EBP の機能制御やエピゲノム修飾に及ぼす影響を明らかにし、AML の悪性化に関わる新たな知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞株の樹立

Trib1 の発現量の違いによる白血病細胞の性質及び遺伝子発現の比較を行うため、Trib1 KO マウス由来の造血細胞に Hoxa9 を導入して不死化細胞を作製し(Trib1 null: Trib1 KO+Hoxa9)、さらに Trib1 を強制発現した細胞(Trib1 hi: Trib1 KO+Trib1/Hoxa9)を樹立した。

#### (2) 遺伝子発現プロファイル

Trib1 null 及び Trib1 hi 細胞から回収した mRNA を、Genome 430 PM Array(Affymetrix)を用いて遺伝子発現解析を行った。さらに、得られたデータから、GSEA-P 2.0 software を用いて GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)解析を行った。

#### (3) クロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)

Trib1 null 及び Trib1 hi 細胞について、FLAG(Hoxa9)、C/EBP 及び活性化ヒストンマークとして知られるヒストン H3K27ac に対する ChIP を行った。MiSeq(illumine)によるシーケンシングを行い、ChIP DNA の配列データを得た。AME(MEME-Suit version 4.11.2)を用いて、Hoxa9 及び C/EBP のモチーフ解析を行った。さらに、ROSE program により、スーパーエンハンサーの同定を行った。Gene ontology 解析には、GREAT version 4.0.4 を使用した。

#### (4) BRD4 阻害剤 JQ1 の投与実験

Trib1 hi 細胞を骨髄移植して1週間後、JQ1(50 mg / kg)を週5回、3週間マウスに腹腔内投与した。骨髄移植後のマウスは、末梢血の白血球数、ギムザ染色及び GFP 陽性画分を経時的に観察した。

#### (5) ヒト骨髄性白血病細胞株の解析

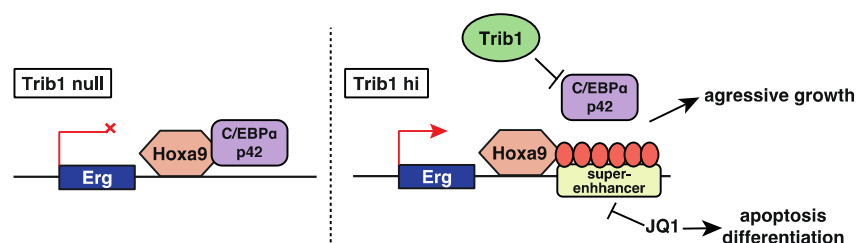
ヒト骨髄性白血病細胞株 KU812、P39 及び HL-60 を用いて、JQ1 処理による細胞増殖への影響と Trib1/Hoxa9 標的遺伝子の発現を観察した。さらに、Trib1 のノックダウン細胞を作製し、細胞増殖の影響と Trib1/Hoxa9 標的遺伝子の発現変化を観察した。

### 4. 研究成果

Trib1 の発現量の違いによる白血病細胞の性質を明らかにするため、まず Trib1 null (Trib1 KO+Hoxa9)及び Trib1 hi (Trib1 KO+Trib1/Hoxa9)の細胞増殖を比較した。その結果、Trib1 hi 細胞において増殖速度と細胞周期進行の亢進が認められた。さらに、in vivo の骨髄移植において Trib1 hi 細胞のみが白血病を発症した。また、C/EBP p42 の分解や MAPK リン酸化亢進は、Trib1 hi で顕著であった。Trib1 hi 及び null 細胞について、マイクロアレイによる遺伝子発現解析をしたところ、細胞周期関連遺伝子に關与する遺伝子群が Trib1 hi でエンリッチしていた。

続いて Trib1 hi 及び null 細胞について ChIP-seq 解析により、Hoxa9 と C/EBP の DNA 結合領域の網羅的解析を行った。その結果、Trib1 null の Hoxa9 特異的結合箇所 3,081 箇所の内、1,864 箇所が C/EBP 特異的結合箇所とオーバーラップすることが明らかになった。一方、ヒストン H3K27ac のピーク箇所には Trib1 hi と null 細胞で顕著な違いはなかったことから、ヒストン H3K27ac のピークの頻度や大きさに着目して、Rose アルゴリズムを用いたスーパーエンハンサーの検出を行った。その結果、Trib1 hi 細胞では、Erg、Spns2、Rgl1、及び Pik3cd の遺伝子座にヒストン H3K27Ac シグナルが増大したスーパーエンハンサーの領域が認められ、遺伝子発現の増加が確認された。これらスーパーエンハンサーの活性は、Trib1 による C/EBP p42 の分解が重要であり、Trib1 による MEK/ERK 経路の活性化の寄与はわずかであることが明らかになった。また、Trib1/Hoxa9 の標的遺伝子である Erg のノックダウンは、Trib1 hi 細胞の細胞増殖及び AML 発症能を有意に抑制したことから、Erg が Trib1/Hoxa9 の重要な下流ターゲットであることが示された。さらに、スーパーエンハンサーの構成因子である BET 系プロモドメインタンパク BRD4 の阻害剤 JQ1 は、in vitro 及び in vivo の両方で Trib1/Erg 依存的に増殖を抑制することが明らかになった。

また、ヒト AML 細胞株で、TRIB1 及び HOXA9 の発現を比較した結果、KU812、P39 及び HL-60 が高い発現を示した。TRIB1 のノックダウンは細胞増殖を抑制し、ERG の発現低下を示した。さらに、ヒト AML 細胞株でも同様に、JQ1 は増殖抑制効果を示し、ERG の発現を有意に抑制した。これらの結果から、TRIB1/ERG 経路はヒト白血病細胞の増殖に重要な役割を果たしており、JQ1 による BRD4 阻害が潜在的な治療戦略であることが示された。現在、以上の内容を投稿中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Seiko Yoshino, Takashi Yokoyama, Takuro Nakamura
2. 発表標題 Trib1 Modulates Transcriptional Functions of Hoxa9 in AML
3. 学会等名 The 9th JSH International Symposium 2018 in Kyoto
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiko Yoshino, Takashi Yokoyama, Takuro Nakamura
2. 発表標題 Trib1 functions as a critical epigenetic regulator in AML
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiko Yoshino, Takashi Yokoyama, Takuro Nakamura
2. 発表標題 Trib1 functions as a critical epigenetic regulator in AML
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芳野 聖子、横山 隆志、中村 卓郎
2. 発表標題 Trib1はAML発症においてエピゲノム修飾因子として機能する
3. 学会等名 平成30年度【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芳野 聖子、横山 隆志、中村 卓郎
2. 発表標題 エンハンサーリプログラミングを標的とするAMLの治療法開発
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芳野聖子、角南義孝、横山隆志、中村卓郎
2. 発表標題 Trib1によるエンハンサーリプログラミングと、PROTACを用いた Trib1に対する治療法開発
3. 学会等名 第24回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考