

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17389

研究課題名(和文) C/EBP 変異とBcl11aの協調作用によるAML発症・悪性化機序の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism that C/EBPα and Bcl11a induces AML development and progression

研究代表者

角南 義孝 (SUNAMI, Yoshitaka)

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：50732864

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)：Trib1により分解されるC/EBP $\alpha$ とBcl11aによるPU.1の機能阻害が協調し、AMLの発症や悪性化を引き起こすという新しい概念を証明することを目的として、本研究を開始した。まずAMLにおいてBcl11aがリクルートするコリプレッサーとして、LSD1、HDAC1/2を同定し、これらの阻害剤がBcl11a発現AML細胞特異的な腫瘍抑制効果を有することを示した。またBcl11a新規標的遺伝子として、E3ユビキチンリガーゼAsb2を同定し、Bcl11a-Asb2-Filamin経路を介したAML細胞の骨髄生着促進により、Bcl11aがAMLの発症・増悪を引き起こす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

C/EBP $\alpha$ とPU.1は顆粒球系・単球系細胞の分化において競合的に働くと考えられており、これらの異常が協調してAMLを誘導するという先行研究はこれまでにない。また今回、同定したBcl11a新規標的遺伝子Asb2のAMLにおける役割については、これまでに十分な検討がされておらず、本研究の学術的意義は高い。LSD1/HDAC阻害剤がAMLに有用であることが、複数の臨床試験により証明されており、Bcl11aはLSD1/HDAC阻害剤の治療効果予測因子となりうる。またBcl11a-Asb2経路を治療標的とすることでAMLの新規治療法開発につながる可能性があり、本研究で得られた成果は社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：C/EBP $\alpha$  and PU.1 are transcriptional factors that regulates myeloid differentiation in normal hematopoiesis, and these 2 factors act as tumor suppressors in AML. The pseudokinase Trib1 induces the degradation of C/EBP $\alpha$  p42 isoform, whereas transcriptional repressor Bcl11a suppresses the transcriptional activity of PU.1 by recruiting corepressors. We previously revealed that Bcl11a cooperates with Trib1 in the development of AML. In this project, we attempted to clarify that C/EBP $\alpha$  abnormality and Bcl11a-repressed PU.1 activity cooperatively induces AML development and progression. First, we found LSD1 and HDAC1/2 as corepressors that are recruited by Bcl11a in AML cells. Second, treatment of AML cells with LSD1/HDAC inhibitors resulted in the growth inhibition in a Bcl11a-expression dependent manners. Finally, we identified E3 ubiquitin ligase Asb2 as a novel Bcl11a target gene that promotes the engraftment of AML cells, subsequently induces AML development and progression.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病 Bcl11a Asb2 LSD1/HDAC阻害剤 骨髄生着

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

正常造血において転写因子は幹細胞の維持、分化方向の運命決定、そして血球の成熟に関与している。一方、急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia: AML) では、複数の転写因子の機能が遺伝子変異、染色体異常、発現量低下などにより破綻しており、これが白血病化の原因となっている。しかし、これらの転写因子がそれぞれどのように相互作用して、白血病を誘導しているかについては明らかになっていない。

私が所属する研究室はこれまでに AML 原因遺伝子である Hoxa9/Meis1 の協調遺伝子として pseudokinase 蛋白質をコードする Trib1 を同定した (Blood. 109: 3998-4005, 2007)。さらに Trib1 が MEK1/ERK1 経路の活性化を介して顆粒球分化に必須の転写因子である C/EBP $\alpha$  を分解し、AML を発症させることを証明した (Blood. 116: 2768-75, 2010)。また本研究開始前の予備実験により、Trib1 の協調遺伝子として zinc-finger 蛋白質をコードする Bcl11a を同定し、Bcl11a が顆粒球・単球細胞の分化を促す転写因子である PU.1 の機能を阻害して、AML を発症・増悪させることを明らかにした。以上から、Trib1 と Bcl11a が下流の転写因子である C/EBP $\alpha$  の分解と PU.1 の機能阻害を介して AML を発症・増悪させていると考えた。さらに AML 患者では、C/EBP $\alpha$  の変異が他の遺伝子変異に比べて高頻度に見られることから、C/EBP $\alpha$  変異と Bcl11a による PU.1 機能阻害が協調して、AML を発症・悪性化させるというモデルを着想した。これを証明し、さらには C/EBP $\alpha$  変異と Bcl11a が AML を発症させるメカニズムを明らかにすることで、最終的には AML が発症・悪性化する分子基盤を解明できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、C/EBP $\alpha$  の機能破綻と Bcl11a による PU.1 の機能阻害が協調し、AML の発症や悪性化を引き起こすという新しい概念を証明し、最終的には AML 発症・悪性化の分子メカニズムを解明することを目的としている。将来的には、本研究で得られた成果を礎とし、これらを標的とする新規治療法開発につなげることを目標としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) Bcl11a による PU.1 機能阻害に関わるコリプレッサーの同定

Bcl11a に結合することが報告されているコリプレッサーに対する shRNA を作成後、Trib1/Bcl11a 発現マウス AML 細胞株 (TB-13 細胞) 内で、これらのコリプレッサーをノックダウンし、Bcl11a 標的遺伝子の発現回復を指標に、Bcl11a が AML 細胞においてリクルートするコリプレッサーを探索した。次に、同定したコリプレッサーに対する阻害剤である、LSD1 阻害剤と HDAC 阻害剤を用いて TB-13 細胞を処理し、*in vitro* で Bcl11a 発現細胞株特異的な細胞増殖抑制効果が観察されるかを検証した。さらに TB-13 細胞をマウスへ骨髄移植した *in vivo* モデルにおいても、LSD1 阻害剤と HDAC 阻害剤が AML 発症を抑制するかを検討した。また LSD1/HDAC 阻害剤により発現が回復する遺伝子を探索し、Bcl11a により発現低下する遺伝子や ChIP-seq 解析の結果と合わせることで、Bcl11a の新規標的遺伝子の同定を試みた。

#### (2) Bcl11a 新規標的遺伝子 Asb2 の AML における役割の解明

TB-13 細胞にレトロウイルスベクターを用いて Asb2 を過剰発現させ、この細胞をマウスに骨髄移植した際に白血病発症が阻害されるかを調べた。次に Asb2 のエンハンサー領域で、Bcl11a/PU.1 が結合している領域を CRISPR/Cas9 システムを用いて削除した変異体を作成し、これを TB-13 細胞へ導入した。そして変異体発現 TB-13 細胞で Asb2 発現が回復するかを検討した後、*in vitro* での細胞増殖能、自己複製能、細胞遊走能、そして接着能を評価した。さらに、この変異体発現 TB-13 細胞をマウスに移植した時に骨髄への生着が阻害されるかを検証した。また、Trib1 のみを発現する AML 細胞 (Tr1 細胞) を用いて、Asb2 をノックダウンした時に、Asb2 基質である filamin A の発現や、細胞遊走能・接着能が回復するかを調べた。

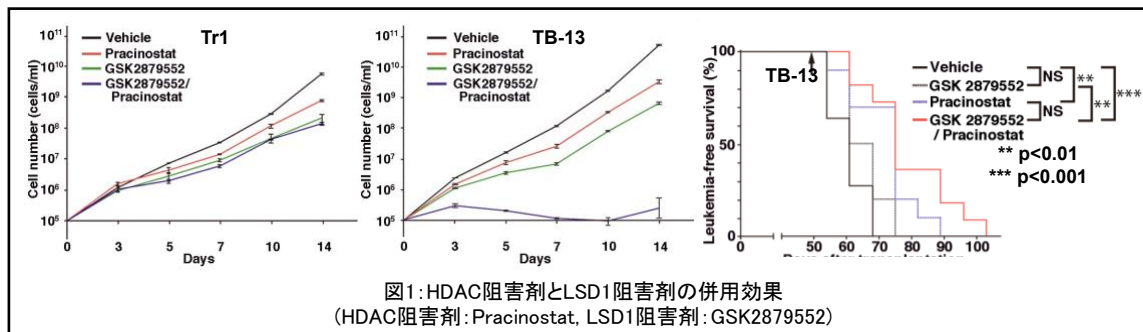
最後に BCL11A が高発現しているヒト AML 細胞株 HL-60 において、BCL11A をノックダウンさせた時や LSD1/HDAC 阻害剤で処理した際に ASB2 発現が回復するかを確認した。またデータベースを用いた AML 患者コホートの解析を行い、BCL11A と ASB2 発現の関係を探索した。

### 4. 研究成果

#### (1) Bcl11a による PU.1 機能阻害に関わるコリプレッサーの同定

これまでに zinc-finger 蛋白質をコードする Bcl11a が、顆粒球細胞の分化を制御する転写因子 PU.1 と結合し、その転写活性を抑制することで標的遺伝子の発現を低下させ、AML 発症・悪性化を引き起こしていることを明らかにしている。また Bcl11a は転写抑制因子として働き、様々なコリプレッサーをリクルートすることが証明されている。TB-13 細胞で、Bcl11a に結合するコリプレッサーをノックダウンしたところ、LSD1、HDAC1/2、Ncor1/2 をノックダウンした時に Bcl11a 標的遺伝子の発現が回復することがわかった。この中から阻害剤が取得可能な LSD1、HDAC1/2 に着

目し、LSD1阻害剤とHDAC阻害剤のTB-13細胞に対する効果を調べたところ、これらの阻害剤を併用した時にBcl11a発現細胞株特異的な腫瘍抑制効果が観察され、さらにTB-13細胞をマウスへ移植したAMLモデルマウスを用いた実験により、LSD1/HDAC阻害剤のAML発症抑制効果を*in vivo*においても確認した(図1)。またLSD1/HDAC阻害剤により発現が回復する遺伝子と、マイクロアレイ解析やChIP-seq解析によりこれまでで得られているBcl11a新規標的遺伝子候補を重ね合わせ、最終的にE3ユビキチンリガーであるAsb2をBcl11aの新規標的遺伝子として同定した。

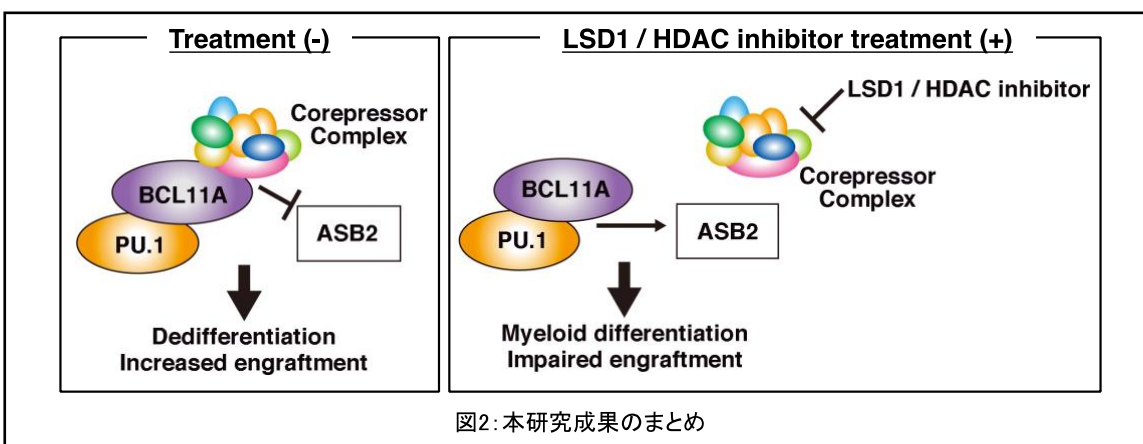


## (2) Bcl11a 新規標的遺伝子 Asb2 の AML における役割の解明

Bcl11a 新規標的遺伝子 Asb2 の AML における役割についての機能解析を行った。TB-13 細胞において Asb2 を過剰発現させると、*in vitro*での細胞増殖能・自己複製能が低下し、細胞遊走能や接着能が低下した。さらに Asb2 過剰発現 TB-13 細胞を用いた骨髄移植実験を行い、マウス骨髄への生着が阻害され、白血病発症が阻害されることを明らかにした。次に、Bcl11a による Asb2 制御が、AML 発症に重要な役割を担っていることを示す目的で、Asb2 のエンハンサー領域で、Bcl11a/PU.1 が結合している領域を削除した変異体を作成し、TB-13 細胞へ導入した。この変異体発現 TB-13 細胞は、Asb2 発現が亢進し、Asb2 過剰発現 TB-13 細胞と同様に、*in vitro*で細胞増殖能・自己複製能が低下し、細胞遊走能や接着能が低下した。さらに、この変異体発現 TB-13 細胞をマウスに移植すると、骨髄生着が阻害された。

Asb2 は基質である filamin A を介して、細胞接着に関わることが報告されている。そこで Trib1 のみを発現する Tr1 細胞と TB-13 細胞を比較し、TB-13 細胞では filamin A 発現が亢進していることを確認した。さらに Asb2 過剰発現 TB-13 細胞や変異体発現 TB-13 細胞では、filamin A の発現が Tr1 細胞と同程度まで低下していた。反対に、Tr1 細胞を用いて、Asb2 をノックダウンしたところ、Asb2 の基質である filamin A の発現が亢進し、細胞遊走能や接着能が回復した。これにより、Bcl11a-Asb2-Filamin 経路を介して、Bcl11a が AML 細胞の骨髄生着を促進し、AML の発症・増悪を引き起こしていると考えられた。

最後にヒト AML 細胞における BCL11A/ASB2 の役割を解明する目的で、BCL11A を高発現するヒト AML 細胞株 HL-60 を用い、BCL11A ノックダウンや LSD1/HDAC 阻害剤が ASB2 発現を回復させることを確認した。さらに実際の AML 患者での BCL11A/ASB2 の役割を調べる目的で、大規模データベースを用いた AML 患者コホートの解析を行い、BCL11A と ASB2 の発現が逆相関関係にあることを示した。以上より、Trib1 が C/EBPα を分解する一方で Bcl11a が PU.1 の機能を抑制し、両者の機能により AML の悪性化を進展させていることが示唆された(図 2)。これらの研究成果は、Blood Advances 誌で報告した(*Blood Adv.* 6(6): 1827-1843, 2022)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshino S, Yokoyama T, Sunami Y, Takahara T, Nakamura A, Yamazaki Y, Tsutsumi S, Aburatani H, Nakamura T	4. 巻 137
2. 論文標題 Trib1 promotes acute myeloid leukemia progression by modulating the transcriptional programs of Hoxa9.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 75-88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2019004586.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawabata H, Fujimoto S, Sakai Ti, Yanagisawa H, Kitawaki T, Nara K, Hagihara M, Yamamoto H, Tanimizu M, Kato C, Origuchi T, Sunami K, Sunami Y, Masunari T, Nakamura N, Kobayashi M, Yamagami K, Miura K, Takai K, Aoki S, Tsukamoto N, Masaki Y.	4. 巻 114
2. 論文標題 Patient's age and d-dimer levels predict the prognosis in patients with TAFRO syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 179 ~ 188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-021-03159-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshino Seiko, Tanaka Miwa, Sunami Yoshitaka, Takahara Tomoko, Yamazaki Yukari, Homme Mizuki, Niibori-Nambu Akiko, Osato Motomi, Minami Takashi, Ishihara Keiichi, Nakamura Takuro	4. 巻 36
2. 論文標題 Trib1 promotes the development of acute myeloid leukemia in a Ts1Cje mouse model of Down syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 558 ~ 561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-021-01384-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sunami Yoshitaka, Yokoyama Takashi, Yoshino Seiko, Takahara Tomoko, Yamazaki Yukari, Harada Hironori, Nakamura Takuro	4. 巻 6
2. 論文標題 BCL11A promotes myeloid leukemogenesis by repressing PU.1 target genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1827 ~ 1843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2021004558	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sunami Y, Yoshino S, Yokoyama T, Nakamura T.
2. 発表標題 Bcl11a promotes myeloid leukemogenesis by abrogating transcriptional activity of PU.1.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角南義孝, 芳野聖子, 横山隆志, 中村卓郎
2. 発表標題 Bcl11aはPU.1の転写活性阻害によりAMLの発症と悪性化を促進する
3. 学会等名 先端モデル動物プラットフォーム2020年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sunami Y, Yoshino S, Yokoyama T, Nakamura T.
2. 発表標題 BCL11A promotes myeloid leukemogenesis by abrogating transcriptional activity of PU.1.
3. 学会等名 39th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sunami Y, Nakamura T.
2. 発表標題 BCL11A promotes myeloid leukemogenesis by abrogating transcriptional activity of PU.1
3. 学会等名 FASEB hematologic Malignancies Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sunami Y, Yoshino S, Nakamura T.
2. 発表標題 The role of Cop1 in AML development and progression.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角南義孝, 芳野聖子, 中村卓郎
2. 発表標題 AMLの発症と悪性化におけるE3ユビキチンリガーゼCop1の役割
3. 学会等名 第26回 造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角南 義孝
2. 発表標題 Bcl11a は PU.1 標的遺伝子の抑制を介して AML の発症・悪性化を促進する
3. 学会等名 令和3年度がん進展 制御研究所 共同利用・共同研究拠点研究成果報告会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 角南義孝, 中村卓郎.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本臨床腫瘍学会・日本癌学会・日本癌治療学会	5. 総ページ数 90
3. 書名 よくわかるがんゲノム医療. Q&A. Q9-10	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------