

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07095

研究課題名(和文) TRIB1によるEMT関連遺伝子の転写活性化を介したがん転移促進機能の解明

研究課題名(英文) TRIB1 promotes metastasis through transcriptional activation of EMT-related genes

研究代表者

横山 隆志 (Yokoyama, Takashi)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：00535833

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)：白血病関連遺伝子であるTRIB1について、本研究では固形がんにおける重要性を検証した。ヒト肺癌細胞株A549細胞においてゲノム編集によりTRIB1-KO細胞を作製し、さらに各種TRIB1機能不全変異体を再導入して細胞機能やin vivoでのがん形質における機能について調べた。特に足場非依存性増殖やヌードマウスへの尾静脈移植による肺への定着についてはTRIB1によるMAPキナーゼ経路の活性化とC/EBP β の分解の両方が必要であることが示され、固形がんにおいてもTRIB1が有用な治療標的になりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではTRIB1が急性骨髄性白血病だけでなく、肺癌などの難治性固形がんにおいても重要な役割を持つことを明らかにした。特に転写因子C/EBP β については、これまで血球系細胞や脂肪細胞分化以外での機能は不明な点が多かったが、本研究結果によりTRIB1によるC/EBP β の分解が肺癌細胞の悪性化に必要であることが明らかになり、将来的な治療標的となる可能性を示すものとなった。

研究成果の概要(英文)：In this research, we investigated the significance of TRIB1, a gene associated with leukemia, in solid tumors. We generated TRIB1-KO cells in the human lung cancer cell line A549 using genome editing and reintroduced various TRIB1 mutants to explore its cellular and in vivo functions in cancer progression. Our findings revealed that the activation of the MAP kinase pathway and the degradation of C/EBP β by TRIB1 were necessary for anchorage independent growth and lung engraftment after tail vein injection in nude mice. These results suggest that TRIB1 may be a promising therapeutic target for solid tumors.

研究分野：腫瘍学

キーワード：TRIB1 C/EBP TGF- β Smad3 がん幹細胞性 EMT 転移・浸潤

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

pseudokinase である TRIB1 は、MEK との結合による MAP キナーゼ経路の活性化の持続と、ユビキチンリガーゼ COP1 依存的な C/EBP α の分解により白血病幹細胞性を誘導し、マウス骨髄移植モデルにおいて急性骨髄性白血病を 100% 発症させる。一方で固形がんにおける TRIB1 の機能については不明な点が多かった。私達は TRIB1 がヒト肺がん細胞株 A549 細胞への TGF- β 刺激により発現誘導され、C/EBP α タンパク質の分解が促進されることを見出した。さらに C/EBP α が EMT 関連遺伝子の発現を制御することに着目し、TRIB1 が C/EBP α の分解を介して EMT の誘導や転移・浸潤などのがん悪性化に寄与している可能性について検証を行った。

2. 研究の目的

本研究では固形がんにおける TRIB1 の機能として、TGF- β /Smad 経路によるがん形質の促進における機能について検証する。TRIB1 のノックアウトおよび TRIB1 機能不全変異体の導入によって固形がんにおける TRIB1 の機能を明らかにし、TGF- β /Smad 経路の新たながん関連下流因として将来的な治療標的となる可能性を模索する。

3. 研究の方法

A549 細胞において CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いて *TRIB1*-KO 細胞を複数クローン作製した。この *TRIB1*-KO 細胞にレンチウイルスによって野生型 TRIB1、TRIB1 Δ ILL (MEK 結合部位を欠失) または TRIB1 KR (C/EBP α 結合部位に変異) 変異体をそれぞれレンチウイルスによって再導入した。これらの細胞を用いて増殖速度、低血清下での生存、TGF- β 誘導性の運動性の亢進および足場非依存性増殖といった細胞機能における TRIB1 の役割について検証を行った。さらにヌードマウスの尾静脈からこれらの細胞を移植し、肺への定着を IVIS Imaging System によって評価した。

4. 研究成果

TRIB1-KO 細胞は低血清条件において、ERK1/2 のリン酸化や細胞増殖速度が減少し、TGF- β 刺激による細胞運動能の亢進も抑制された。*TRIB1*-KO 細胞に TRIB1 Δ ILL 変異体 (MEK 結合配列を欠失) を再導入したところ細胞運動能を回復させたが、ERK1/2 のリン酸化や増殖速度は回復しなかった。一方で TRIB1 KR (K207R, C/EBP α と結合しない) 変異体を *TRIB1*-KO 細胞に再導入した場合は ERK1/2 のリン酸化や増殖速度は回復するが、細胞運動能は回復しなかった。また、*TRIB1*-KO 細胞では足場非依存性増殖能が低下したが、これは増殖速度を回復させることができる TRIB1 KR 変異体を再導入しても回復しなかった。次に *in vivo* における機能について調べるため、ルシフェラーゼを発現させた細胞をヌードマウスの尾静脈から移植し、IVIS イメージングによる解析

を行った。移植 4 週間後において A549 細胞の親株と、*TRIB1*-KO 細胞に *TRIB1* を再導入した細胞は肺への定着が見られたが、*TRIB1*-KO 細胞の定着は著しく減少した。また、*TRIB1*ΔILL および KR 変異体の再導入細胞はいずれも肺への定着能を回復せず、*TRIB1* による MAP キナーゼ経路の活性化と C/EBPα の分解はどちらも *TRIB1* による発がん機能に必須であることが示された。in vivo におけるがん細胞の定着、進展への影響を調べるため、ルシフェラーゼを発現させた A549 細胞と *TRIB1*-KO および *TRIB1* 変異体の再導入細胞をそれぞれヌードマウスの尾静脈から移植し、IVIS イメージングシステムによる解析を行った。移植 4 週間後において A549 細胞の親株と、*TRIB1*-KO 細胞に *TRIB1* を再導入した細胞は肺への定着が見られたが、*TRIB1*-KO 細胞の定着は著しく減少した。また、*TRIB1*ΔILL および KR 変異体の再導入細胞はいずれも肺への定着能を回復せず、*TRIB1* による MAP キナーゼ経路の活性化と C/EBPα の分解はどちらも *TRIB1* による発がん機能に必須であることが示された。

細胞運動能やがん幹細胞性の促進に関わる C/EBPα 標的遺伝子を探索するため、公的データベースにおいて、C/EBPα をノックダウンしたヒト乳がん細胞株の RNA-Seq データセット (GSE132649) を用いて再解析を行った。C/EBPα のノックダウンにより SOX2 や WNT5B、β-catenin の発現が上昇していた、実際に *TRIB1*-KO 細胞では TGF-β 刺激を行っても β-catenin の発現上昇が見られず、*TRIB1*-C/EBPα の下流遺伝子の候補の一つと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山隆志, 齋藤 正夫, 宮澤恵二
2. 発表標題 TRIB1 regulates TGF- β -induced cell motility through degradation of C/EBP
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生化学講座第2教室 - 山梨大学医学部 https://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche02/bioch2.html
--

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
---------	---------