

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 27 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430121

研究課題名(和文) シグナル伝達と転写制御を結ぶ白血病原因遺伝子TRIB1の解析

研究課題名(英文) Trib1 is an important adaptor that connects the MAP kinase pathway with C/EBPa in leukemogenesis

研究代表者

横山 隆志 (Yokoyama, Takashi)

公益財団法人がん研究会・発がん研究部・研究員

研究者番号：00535833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：白血病遺伝子Trib1の発現量の異なるHoxa9導入不死化細胞Trib1 hi, lo, nullを比較すると、hiにおいて細胞増殖や細胞周期の進行、ERK1/2のリン酸化が亢進していた。Hoxa9とC/EBPaのDNA結合領域をChIP-seqにより解析し、同定したHoxa9標的遺伝子候補のうちCdk6, Kit, Cd44およびCd34はTrib1によって発現誘導され、Idh1, Tet2およびVcam1は発現抑制された。Trib1はC/EBPaの分解によるHoxa9の転写機能の修飾やC/EBPa標的である癌抑制遺伝子の発現抑制により、増殖や細胞周期の亢進を誘導する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Trib1 is a collaborator of Hoxa9/Meis1 in AML and it by itself induces AML through enhancement of MAP kinase signaling and degradation of C/EBPa. Biological phenotypes of Hoxa9-immortalized cells with different Trib1 expression status, Trib1 hi, Trib1 lo and Trib1 null, were compared. Proliferation, DNA synthesis and pERK was increased in the Trib1 hi cell. Genome-wide DNA-binding region of Hoxa9 and C/EBPa were then assessed in Trib1 hi, Trib1 lo and Trib1 null and potentially important Hoxa9 and C/EBPa target genes were searched in nearest neighbor genes of their binding peaks of which expression was 1.5-fold up- or down-regulated by Trib1 overexpression. Cdk6, Kit, Cd44, and Cd34 are such Hoxa9 target candidates up-regulated by Trib1. Also, Idh1, Tet2 and Vcam1 are down-regulated genes. These results suggested that Trib1 might alter cell cycle progression and differentiation by modulating Hoxa9-mediated transcriptional program and by repressing C/EBPa target tumor suppressor genes.

研究分野：医薬理学

キーワード：Trib1 C/EBP Hoxa9 Bcl11a 白血病 ノックアウトマウス ChIPシーケンス

1. 研究開始当初の背景

多くの白血病ではシグナル伝達系と転写調節系の両者の異常を有しており、白血病の発症と進展には単独の分子異常では不十分であることが指摘されている。申請者のグループは、Hoxa9/Meis1 による AML 発症における協調遺伝子として pseudokinase 蛋白をコードする Trib1 を同定した (Jin et al. *Blood*, 109:3998, 2007)。Trib1 は、単独でマウス骨髓細胞に導入しても迅速に白血病を誘導する強力ながん遺伝子であることも明らかとなった。その分子機構として、Trib1 は MEK1 に結合することで、MEK1/ERK1 経路の亢進する一方で、C/EBP α と直接結合し、MEK1/ERK 経路の活性化を介して C/EBP α の分解を誘導する (Yokoyama et al. *Blood*, 116:2768, 2010, Yokoyama & Nakamura. *Cancer Sci*, 102:1115, 2011)。すなわち、Trib1 の強力な発がん活性は、シグナル伝達系と転写調節系に同時に異常を付与することにあると考えられる。さらに申請者らは、ダウン症候群関連急性巨核球性白血病において TRIB1 の機能獲得型変異を同定し、ヒト白血病における TRIB1 の重要性についても明らかにした (Yokoyama et al. *Blood*, 119:2608, 2012)。また正常造血における機能として、申請者らは Trib1 KO マウスを作製し、骨髓での顆粒球分化の促進と C/EBP α の増加が見られることを明らかにしている。このように Trib1 の MEK1/ERK 経路のリン酸化亢進と C/EBP α の分解が白血病発症能の分子基盤となっていることを明らかにしているが、Trib1 による MEK1/ERK の促進機構の詳細と、C/EBP α 分解の機能的意義は不明な点が多かった。

2. 研究の目的

Trib1 による MEK1/ERK 経路の亢進機構と C/EBP α の分解の効果を解明し、白血病発症における意義を明らかにする。

Trib1 の発現量の違いによる、白血病細胞の表現系および遺伝子発現を比較し、白血病発症における機能を解明する。

Trib1/Hoxa9 の協調作用に着目し、Hoxa9 と C/EBP α 間の協調的 DNA 結合の変化を ChIP シークエンスにより網羅的に解析し、Hoxa9 の転写制御機構の変化と白血病発症における標的遺伝子の探索を行うことで Trib1 による C/EBP α 分解の機能的意義を明らかにする、

さらに Trib1 の協調遺伝子として同定した Bcl11a との協調作用について調べ、Trib1 の新たな白血病発症機構を明らかにする。

3. 研究の方法

Trib1 の発現量による Hoxa9 によって不死化した細胞を Trib1 KO マウス由来 (Trib1 null) と野生型マウス由来 (Trib1 low) の造血細胞より作製し、さらに Trib1 を強制発現した細胞 (Trib1 high) の三者において Trib1 の発現量の違いによる白血病の性質および遺伝子発現の比較を行った。さらにこの三者において Trib1 による C/EBP α 分解の機能的意義と Trib1/Hoxa9 の協調作用を明らかにするために、gene expression array 解析と Trib1 の導入により Hoxa9 と C/EBP α 間の協調的 DNA 結合の変化を ChIP シークエンスにより網羅的に解析し、Hoxa9 の転写制御機構の変化と白血病発症における標的遺伝子の探索を行った。

Trib1 誘導 AML における Bcl11a の機能を明らかにするために、野生型および Bcl11a KO マウスの胎児肝由来造血細胞に Trib1 を導入して不死化細胞を樹立し、gene expression array により遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

[Trib1 による Hoxa9 転写機能の修飾]

Trib1 high, low および null 白血病細胞を樹立し比較を行ったところ、ギムザ染色による形態観察をでは未成熟な myeloid leukemia の形態を示すが、Trib1 hi においては一部で分化の進行した細胞が見られた。液体培養における増殖を比較したところ Trib1 hi の細胞では増殖速度と細胞周期の進行が亢進していた。また Trib1 hi では IL-3 刺激後の ERK1/2 のリン酸化の亢進しており、null では low 比較してやや減弱が見られた。

この3者においてマイクロアレイによる遺伝子発現解析をおこなった結果、Sox4, Cd44, Msi2 および Kit といった白血病や造血に関与する遺伝子が Trib1 hi のグループで高発現していた。また Trib1 hi において CyclinD2, CyclinB1 and Cdk4 の発現が高く、実際の immunoblotting でも Cdk4 および CyclinD1 の発現量は Trib1 hi で高かった。一方 Cdk inhibitor の発現は Trib1 hi で低かった。さらに GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) におい

て C/EBP α の標的遺伝子や細胞周期に関与する遺伝子セットが含まれており、これらの結果から Trib1 によって細胞周期の亢進が引き起こされていることが考えられた。

Trib1 による Hoxa9 の転写機能に対する機能を調べるため、Trib1 hi, low および null における Hoxa9 の DNA 結合領域と、Trib1 null における C/EBP α の DNA 結合領域をそれぞれ ChIP シークエンスにより解析し比較を行った。Hoxa9 の DNA 結合領域はそれぞれ 5153 (hi), 1764 (low), 3081 (null) か所あり、3 者で共通の結合領域は 1106 か所であった。Trib1 null において Hoxa9 と C/EBP α の結合領域は 1862 か所でオーバーラップしていたが、これら Hoxa9 結合領域の中で 606 か所は Trib1 hi 消失し、一方で 766 か所の新たな Hoxa9 結合領域が見られた。これらの結果から Hoxa9 と C/EBP α の DNA 結合領域はしばしばオーバーラップしており、Trib1 は C/EBP α の分解を介して Hoxa9 の転写機能を修飾し、標的遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。次に、Trib1 による転写機能の修飾により発現が制御される Hoxa9 標的遺伝子の探索を行った。ChIP-Seq による Hoxa9 の DNA 結合ピークの近傍遺伝子の中から、マイクロアレイ解析の結果 Trib1 hi と null で 1.5 倍以上発現に差の見られる遺伝子をピックアップした。これら Hoxa9 標的遺伝子の候補のうち、Erb3, KitCd34, Cd44, Cdk6 および E2f3 は Trib1 によって発現誘導され、一方で Idh1, Tet2 および Vcam1 は Trib1 によって発現抑制されることが明らかになった。これらの結果から、Trib1 は C/EBP α の分解による Hoxa9 の転写機能の修飾や C/EBP α 標的である癌抑制遺伝子の発現抑制により、細胞の増殖や細胞周期の亢進を誘導する可能性が考えられた。

[Trib1 と Bcl11a の協調作用]

Trib1 の導入によって誘導されたマウス AML37 症例中 9 症例において、レトロウイルスによるタギングから共通挿入部位から Bcl11a 遺伝子を同定した。マウス骨髄移植実験の結果 Bcl11a 単独の強発現では AML を誘導しなかったが、Trib1/Bcl11a を同時に発現させると Trib1 単独よりも迅速に AML 発症を誘導し、Bcl11a も Hoxa9/Meis1 同様に Trib1 との協調を示した。Bcl11a は zinc finger 型転写抑制因子で、プレ B 細胞の分化に必須であ

るが、ヒト CLL において t(2,14)転座による活性化や non-Hodgkin lymphoma における増幅が報告されている。しかしながら AML における報告は少ないため、本研究では Trib1 によって誘導される AML を用いて新たな Bcl11a の機能が解明できることが考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

Takashi Yokoyama and Takuro Nakamura: Modulation of gene expression by Trib1, an AML disease gene and a suppressor of C/EBP α . 第 74 回 日本癌学会学術総会 (名古屋), 2015 年 10 月

Takashi Yokoyama and Takuro Nakamura: The functional role of Trib1 in normal and neoplastic hematopoiesis, Tribbles Pseudokinases on the Crossroads of Metabolism, Cancer, Immunity and Development (Tribbles meeting 2015) (Budapest, Hungary), 2015 年 4 月

横山隆志, 中武真由香, 高原智子, 山崎ゆかり, 中村卓郎: Meis1 標的遺伝子 Sytl1 は CXCL12/CXCR4 シグナルを介して AML の骨髄微小環境への定着を促進する 第 105 回 日本病理学会総会 (名古屋), 2015 年 4 月

Takashi Yokoyama, Mayuka Nakatake and Takuro Nakamura: Sytl1 promotes engraftment of Hoxa9/Meis1-induced AML in bone marrow niche by modulating Flt3 and CXCR4. 第 73 回 日本癌学会学術総会 (横浜), 2014 年 9 月

横山隆志, 中武真由香, 菅野陽平, 高原智子, 山崎淑子, 山崎ゆかり, 中村卓郎: Meis1 標的遺伝子 Sytl1 は AML の骨髄微小環境への定着を促進する 第 103 回 日本病理学会総会 (広島), 2014 年 4 月

Takashi Yokoyama, Mayuka Nakatake, Ayumi Nakamura, Hidetoshi Tahara, Naoya Hatano and Takuro Nakamura: Sytl1/Slp1 functions in the engraftment of AML into the bone marrow. 第 72 回 日本癌学会学術総会 (横浜), 2013 年 10 月

横山隆志,山崎ゆかり,菅野陽平,高原智子,
中村卓郎: Trib1 AMLを利用したBcl11aによる
白血病関連遺伝子制御の解析. 第102回 日本
病理学会総会 (札幌), 2013年6月

〔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〕

がん研究所 発がん研究部 ホームページ
<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/carcinogenesis/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 隆志 (YOKOYAMA Takashi)
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: 00535833

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: