

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16318

研究課題名(和文) Trib1のエンハンサーリプログラミングによるAML悪性化機構の解明

研究課題名(英文) AML malignant mechanism by enhancer reprogramming of Trib1

研究代表者

芳野 聖子 (Yoshino, Seiko)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

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)：ヒトのダウン症に伴う急性巨核芽球性白血病(DS-AMKL)では、Trib1の機能獲得型変異R107Lが同定されており、その過剰発現はマウスAMLの発症を促進することが明らかになっている。ダウン症モデルマウスTs1Cjeを用いて、Trib1のダウン症での白血病発症と悪性化の影響を検討した。Ts1Cjeおよび野生型マウスの骨髄細胞に、Trib1 WTまたはTrib1 R107Lを感染させ、骨髄移植実験を行った。その結果、Trib1 WTおよびTrib1 R107Lを導入したTs1Cjeマウス骨髄細胞は、野生型マウス骨髄細胞と比較し、有意にAML発症を促進することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Trib1の発現の有無で変動するエンハンサーおよびスーパーエンハンサーとエンハンサーに集積する新規転写因子群が明らかになった。今後は、これら転写因子群が正の制御ループを形成し、Trib1によるAML悪性化機構に関与するのかどうかを検証する。さらに、Trib1はダウン症モデルマウスのAML発症を促進し、Trib1を発現するTs1Cje細胞は、野生型細胞と比較して、Hoxa標的遺伝子群の発現がエンリッチしていることが明らかになった。Trib1の関連するシグナルがダウン症関連白血病的悪性化に寄与していることから、TRIB1が治療標的になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Down syndrome is caused by trisomy of chromosome 21 and is the most frequent genetic disorder arising from chromosomal abnormality. Trib1 pseudokinase acts as a collaborator of Hoxa9/Meis1 in leukemogenesis, inducing enhancement of MAPK signals and degradation of C/EBP α . Ts1Cje, a mouse model for DS, is trisomic for approximately 70 genes of human chromosome 21. Here, we aimed to introduce Trib1 in Ts1Cje mice to examine whether the expression of Trib1 cooperates with trisomy 21 in the development of leukemia. Expression of both wild type and R107L Trib1 in Ts1Cje bone marrow cells significantly accelerated disease onset of AML. Additionally, AML cell lines expressing wild type Trib1 were generated in Ts1Cje and B6 bone marrow cells. Gene set enrichment analysis showed the enrichment of the target gene sets of the posterior Hoxa cluster. These data strongly suggest the importance of TRIB1-associated signaling in the transformation and/or malignant progression of DS-related leukemia.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Trib1 Hoxa9 ChIP-seq 白血病 Ts1Cje ダウン症関連白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、転写制御を担うエンハンサーの異常活性化に伴うがん遺伝子発現上昇が、種々のがんでは報告されている(Hnisz et al. *Cell*, 155:4, 2013; Akhtar-Zaidi et al. *Science*, 336:6082, 2012)。その発現上昇の原因の一つとして、スーパーエンハンサーを介した機序が注目を集めている。スーパーエンハンサーは通常のエンハンサーと比べてサイズが巨大であり、強力で安定した遺伝子発現を維持するための調節機構であると考えられている(Loven et al. *Cell*, 153:2, 2013)。Pseudokinase Trib1 は、好中球分化誘導能と強力な細胞周期抑制能を持つ転写因子 C/EBP を分解し、さらに MEK/ERK シグナルを増強するアダプタータンパク質として働く。最近、我々は、Trib1 が C/EBP の分解を介して、Hoxa9 の DNA 結合領域やエンハンサー分布を制御することを明らかにした。また、Trib1 はエンハンサーの中でも、スーパーエンハンサーを改変することで AML の発症と進展をもたらすことを見出した(Yoshino et al. *Blood*, 137:1, 2021)。この様に Trib1 はがん特異的なエンハンサーリプログラミングを制御することから、Hoxa9 以外の転写因子と協調した Trib1 のエピゲノム修飾機構も存在するのではないかと考えた。さらに、本研究で同定される Trib1 の新規協調転写因子は、新たな治療標的につながると考えた。

(2) ダウン症(DS)は21番染色体のトリソミーに起因し、染色体異常から生じる最も頻度の高い遺伝性疾患である。DS児の約10%が一過性骨髄増殖症候群(TMD)を発症し、TMD患者の30%がその後、急性巨核芽急性白血病(DS-AMKL)を発症する。我々はこれまでに、DS-AMKLの一例において TRIB1 の機能獲得型変異 R107L を同定しており、その過剰発現はマウス AML の発症を促進することを明らかにしている(Yokoyama et al. *Blood*, 119:2608, 2012)。これらの結果から、Trib1 を介したシグナル伝達がトリソミー21と協調してDS関連白血病の発生に関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、Trib1 によるエピゲノム修飾を包括的に明らかにし、エンハンサーリプログラミングによる AML 悪性化機構を明らかにする。この目的のため、Trib1 の発現の有無で変動するスーパーエンハンサーを網羅的に調べ、重要な新規転写因子を探索する。

(2) 加えて、ヒト21番染色体に対応する、16番染色体の一部を部分トリソミーとして持つダウン症モデルマウス Ts1Cje を用いて、Trib1 のダウン症での白血病発症と悪性化の影響についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞株の樹立と培養

骨髄細胞は、造血幹・前駆細胞の濃縮を行うため5-FU(150 mg/kg 体重)をマウス(8週齢・)に尾静脈注射し、5日後に骨髄大腿骨・脛骨から回収したものを使用した。Trib1 の発現量の異なる細胞を作製するため、Trib1KO マウス由来の骨髄細胞に Hoxa9 cDNA をレトロウイルスにより導入して不死化細胞を樹立し(Trib1 null: Trib1 KO/ Hoxa9) さらに Trib1 cDNA を過剰発現した白血病細胞(Trib1 hi: Trib1 過剰発現/ Hoxa9)を樹立した。また、Ts1Cje および C57Bl/6J (野生型)マウスの骨髄細胞の性状の比較を行うため、Ts1Cje および野生型マウスの骨髄細胞に Trib1 WT cDNA をレトロウイルスにより導入した白血病細胞を樹立した。

(2) ダウン症モデルマウス

Ts1Cje は代表的な DS モデルマウスの一つであり、トリソミー領域に約70遺伝子をコードし、記憶学習障害をはじめ多岐にわたる特徴を示す(Sago et al. *PNAS*, 95:11, 1998)。先行研究から、Ts1Cje マウスは造血幹細胞や前駆細胞の機能不全があるが、AML を自然発症しないことが明らかになっている(Carmichael et al. *Blood*, 113:9, 2009)。

(3) 遺伝子発現解析

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。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。

(4) クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq)

Trib1 null および Trib1 hi 細胞において、FLAG (Hoxa9) C/EBP およ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 (illumina) 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 および 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。

(5) マウス骨髄移植

Ts1Cje または野生型マウスの造血幹・前駆細胞を5-FU処理により濃縮し、Trib1 WT または Trib1

R107L cDNA をレトロウイルスにより導入した。これらの細胞を、致死量下 (8.5Gy) の放射線照射した野生型マウスに尾静脈注射により移植した。骨髄移植後のマウスは、末梢血の白血球数、ギムザ染色および GFP 陽性画分を経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) Trib1 の発現の有無で変動するエンハンサーおよびスーパーエンハンサーの同定とエンハンサーに集積する転写因子および標的遺伝子を探索する目的のため、Trib1 によるスーパーエンハンサーに対する影響、特に core regulatory circuitry (CRC) としてエンハンサーに集まっていることが予測される転写因子や共役因子の同定を試みた。Trib1 hi 細胞において、スーパーエンハンサーを有する転写因子を抽出し、ヒストン H3K27ac 結合領域のモチーフ解析から、Hoxa9 および C/EBP を含む 6 個の転写因子 (C/EBP、Elf1、Erg、Klf2、Rara、Runx1) を同定した。今後は、これら転写因子群が正の制御ループを形成し、Trib1 による AML 悪性化機構に関与するかどうかを検証する。

(2) Ts1Cje または野生型マウスの骨髄細胞に、Trib1 WT または Trib1 R107L を感染させ、骨髄移植実験を行った。その結果、Trib1 WT および Trib1 R107L を導入した Ts1Cje マウス骨髄細胞は、野生型マウス骨髄細胞と比較し、有意に AML 発症を促進することが明らかになった (図 1)。続いて、Ts1Cje および野生型マウスの骨髄細胞に Trib1 WT を発現させた白血病細胞を樹立し、性状の比較を行った。両細胞は未熟な骨髄形態を示し、Ts1Cje/Trib1 WT 細胞では、巨核球マーカーである CD41 の発現が亢進していた。また、細胞増殖の比較により、Ts1Cje/Trib1 WT 細胞は、野生型 (B6) /Trib1 WT と比較し、有意な増殖の増加が見られた。さらに、両細胞について遺伝子発現解析を行った結果、Ts1Cje/Trib1 WT 細胞では B6/Trib1 WT と比較し、Hoxa クラスター (Hoxa7/9/10) の標的遺伝子群のエンリッチが認められた。また、定量 PCR 解析により、Ts1Cje/Trib1 WT 細胞では、Trib1/Hoxa9 の標的遺伝子である Erg の発現が有意に上昇しており、GSEA 解析の結果と一致して Myb、Bcl2、Fgf2 などの Hoxa 標的遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。さらに、ヒト DS-AMKL 臨床検体の発現解析から、Trib1 の過剰発現で変動する遺伝子群は DS-AMKL で変動する遺伝子群と有意に相関することが明らかになった。

本研究から、Trib1 はダウン症モデルマウスの AML 発症を促進し、Trib1 を発現する Ts1Cje 細胞は、野生型細胞と比較して、Hoxa 標的遺伝子群の発現がエンリッチしていることが明らかになった。Trib1 の関連するシグナルがダウン症関連白血病の悪性化に寄与していることから、TRIB1 が治療標的になる可能性が示唆された (Yoshino et al. *Leukemia*, 36:2, 2022)。

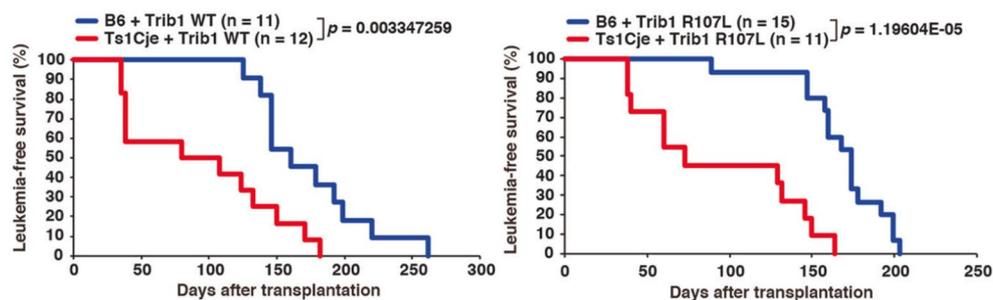


図 1. Trib1 は、Ts1Cje マウスの AML 発症を促進する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sunami Y, Yokoyama T, Yoshino S, Takahara T, Yamazaki Y, Harada H, Nakamura T	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 Adv	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 -

1. 著者名 Yoshino S, Tanaka M, Sunami Y, Takahara T, Yamazaki Y, Homme M, Niibori-Nambu A, Osato M, Minami T, Ishihara K, Nakamura T	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 2022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 該当する

1. 著者名 Yoshino Seiko, Yokoyama Takashi, Sunami Yoshitaka, Takahara Tomoko, Nakamura Aya, Yamazaki Yukari, Tsutsumi Shuichi, Aburatani Hiroyuki, Nakamura Takuro	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Seiko Yoshino, Miwa Tanaka, Yoshitaka Sunami, Tomoko Takahara, Yukari Yamazaki, Motomi Osato, Takashi Minami, Keiichi Ishihara and Takuro Nakamura
2. 発表標題 Trib1 promotes the development of acute myeloid leukemia in the Ts1Cje Down syndrome model mouse
3. 学会等名 The 39th Sapporo International Cancer Symposium（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芳野聖子、横山隆志、角南義孝、高原智子、中村彩、山崎ゆかり、堤修一、油谷浩幸、中村卓郎
2. 発表標題 Trib1 promotes acute myeloid leukemia progression by modulating the transcriptional programs of Hoxa9
3. 学会等名 第16回血液学若手研究者勉強会(麒麟塾) (招待講演)
4. 発表年 2021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Hoxa9の転写プログラムを調節することにより急性骨髄性白血病の進行を促進する
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 芳野聖子、角南義孝、中村卓郎
2. 発表標題 Trib1による骨髄系腫瘍の発症および進展機構
3. 学会等名 第25回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 中村卓郎、芳野聖子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 血液内科 第83巻1号「Trib1によるHoxa9転写制御の修飾とAML発症」	

1. 著者名 芳野聖子, 小松真太郎, 鈴木 洋	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 実験医学部冊「リアルタイム・デジタルPCR実験スタンダード」第2部5章 デジタルPCRによるmiRNAの測定	

1. 著者名 芳野聖子, 中村卓郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 一般社団法人 日本血液学会	5. 総ページ数 1
3. 書名 臨床血液 61巻11号 Introduce My Article	

1. 著者名 芳野聖子, 中村卓郎	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 血液内科 第82巻4号「Pseudokinase TRIB1による骨髄系腫瘍の発症と進展機構」	

〔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
---------	---------