

機関番号：72602

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790333

研究課題名 (和文) Trib1による白血病発症機構の解明

研究課題名 (英文) Leukemogenic activity of Trib1

研究代表者

横山 隆志 (YOKOYAMA TAKASHI)

財団法人癌研究会・癌研究所発がん研究部・研究員

研究者番号：00535833

研究成果の概要 (和文)：

私達はこれまでに *Hoxa9/Meis1* と協調的に機能して白血病の悪性化を引き起こす因子として Trib1 を同定している。本研究において私達は Trib1 が「ILLHPWF」配列を介して MEK1 と結合し、MAP キナーゼ経路を活性化させることが Trib1 による白血病発症に必要であることを明らかにした。さらにこの Trib1 による MAP キナーゼ経路の活性化は C/EBP α の分解にも必須であり、Trib1 は白血病発症において MAP キナーゼ経路と C/EBP α を制御する重要なアダプター分子として機能していることを明らかにした。また私達は *GATA-1* 変異を有するダウン症候群関連急性巨核球性白血病 (DS-AMKL) において TRIB1 の somatic mutation を同定し、この変異により pseudokinase domain 内にある 107 番目のアルギニンがロイシンに置換されることがわかった (R107L)。この TRIB1 の変異は治療によって *GATA-1* 変異を有する白血病クローンの消失後の白血球にもみられることから、*GATA-1* の変異よりも早く造血幹細胞に生じることが考えられた。この R107L 変異の機能を調べるためにマウスの Trib1 R107L 変異体を作製したところ、マウス骨髄移植実験において野生型よりも迅速に白血病を誘導し、ERK1/2 のリン酸化や C/EBP α の分解能が亢進していた。このことから R107L 変異はこの DS-AMKL 症例において gain-of-function mutation である可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Our previous study indicated that *Trib1* is a leukemia disease gene as well as a collaborator of *Hoxa9/Meis1* in myeloid leukemogenesis. We have identified that Trib1 interaction with MEK1 and subsequent enhanced MAPK activity that are mediated with the MEK1 binding motif, ILLHPWF, are key molecular mechanisms for leukemogenesis. In addition, we have clarified that activation of the MAP kinase pathway by Trib1 is also required for degradation of C/EBP α . These studies uncover the role of Trib1 as an important adaptor that connects the RAS-MAPK pathway with C/EBP transcription factors as well as its importance in hematological malignancies. Moreover, we have identified a somatic point mutation of *TRIB1* in a human case of Down syndrome-related acute megakaryoblastic leukemia (DS-AMKL). The point mutation results in amino acid conversion arginine 107 to leucine in the pseudokinase domain. The *TRIB1* R107L mutation remained in leukocytes of the remission stage when the *GATA1* mutation disappeared, indicating that the *TRIB1* mutation is a very early genetic event. Introduction of the *Trib1* R107L mutant into murine bone marrow cells induced AML with shorter latency than that of wild type. Further, the enhancing effects of Trib1 on

phosphorylation of ERK1/2 and degradation of C/EBP α were more remarkable by R107L expression. These results suggest that *TRIB1* R107L is a gain-of-function mutation in a DS-AMKL case.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：Trib1、白血病、MAPK、DS-AMKL

1. 研究開始当初の背景

白血病においてはRasを中心としたシグナル伝達経路との関連性として、受容体型チロシンキナーゼであるFLT3やc-Kitの変異による恒常的活性化、BCR-Ablキメラタンパク質によるキナーゼ活性の上昇、RasのGAP活性をもつNF1の欠損などが報告されているが、このRas/MAPキナーゼ経路を介した白血病の発症機構やこの経路を直接制御する因子などは不明な点が多い。このため、Ras/MAPキナーゼ経路を制御する因子の同定やその機能解析は、白血病発症のメカニズムの解明や治療への応用という点で大変重要であると考えられた。私達はホメオボックス遺伝子*Hoxa9*と*Meis1*をマウス骨髄細胞に導入すると白血病を誘導することを明らかにしており、*Hoxa9/Meis1*と協調的に機能して白血病の悪性化を引き起こす因子としてTrib1を同定している。私達はTrib1がMEK1と結合しMAPキナーゼ経路を亢進させる機能に着目し、Trib1による白血病発症機構の解明を試みた。

2. 研究の目的

本研究はTrib1の白血病原因遺伝子としての機能を明らかにし、白血病診断や治療への応用を目指すため、以下の2点を目的として研究をおこなった。

(1) Trib1結合タンパク質であるMEK1およびC/EBP α との結合・制御機構を調べ、どのように白血病の発症や悪性化を引き起こすかを明らかにする。

(2) TRIB1の変異や発現の亢進がみられる白血病細胞株や白血病症例を探索し、実際の白血病におけるTRIB1の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Trib1がMEK1と結合する点に着目し、Trib1によるMAPキナーゼ経路の制御と白血病発症機構との関連性について調べた。免疫共沈法による結合実験からTrib1のMEK1結合モチーフを探索した。MEK1との結合が白血病発症に必要であるかを検討するためMEK1と結合しないTrib1変異体を作製し、マウス骨髄移植実験をおこなった。またTrib2が細胞周期の進行を抑制する因子であるC/EBP α の分解を引き起こすことに着目し、Trib1を白血病細胞株に導入してC/EBP α の分解について調べた。MEK1と結合しないTrib1変異体はC/EBP α を分解しなかったため、MEK阻害剤を用いてMAPキナーゼ経路とC/EBP α 分解の関連性を検討した。

(2) 弘前大学の伊藤悦朗先生、群馬県立小児医療センターの林泰秀先生との共同研究のもと、ヒト白血病症例における *TRIB1* の機能を解明するためにダウン症候群関連急性巨核球性白血病 (DS-AMKL) において *TRIB1* の変異を探索した。同定された変異体の機能を調べるためにマウス骨髄移植実験をおこない、白血病発症能への影響を調べた。またシグナル制御機構への影響を検討するために MAP キナーゼ経路の亢進と C/EBP α の分解について調べた。

4. 研究成果

(1) 私達は免疫強沈実験により Trib1 の C 末端領域に MEK1 結合配列「ILLHPWF」を同定した。この配列を欠失させた MEK1 と結合しない Trib1 変異体 (Trib1 Δ ILL) は ERK1/2 のリン酸化や自己複製能の亢進を引き起こさず、マウス骨髄移植実験においても白血病を誘導しなかった。これらの結果から Trib1 による白血病発症には MEK1 との結合を介した MAP キナーゼ経路の活性化が必要であることがわかった。さらに Trib1 Δ ILL は C/EBP α の分解を誘導せず、またこの C/EBP α の分解は MEK1 阻害剤によって抑制されることがわかった。本研究において Trib1 は MAP キナーゼ経路と C/EBP α 制御において重要なアダプター分子として機能していることを明らかにし、2010 年の Blood 誌にて発表した。

(2) 私達は DS-AMKL の 1 症例において 107 番目のアルギニンがロイシンに置換される変異 (R107L) を同定した。この *TRIB1* の変異はダウン症候群関連白血病で高頻度に見られる *GATA1* の変異よりも早く造血幹細胞に生じ、治療によって *GATA1* 変異を有する白血病クローンの消失後に *TRIB1* 変異を有する幹細胞が優位になっていることが考えられた。この R107L 変異の機能を調べるためにマウスの Trib1 R107L 変異体を作製したところ、マウス骨髄移植モデルにおいて野生型よりも迅速に白血病を誘導し、また IL-3 刺激による ERK1/2 のリン酸化をより長く持続させた。このことから R107L 変異は gain-of-function mutation である可能性が考えられ、AMKL 症

例における MAP キナーゼ経路の活性化の原因であることが示唆された。現在、以上の研究内容を Blood 誌に投稿中である。

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 2 件)

Takashi Yokoyama and Takuro Nakamura. Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci.*, 102: 1115-1112, 2011, 査読有.

Takashi Yokoyama, Yohei Kanno, Yukari Yamazaki, Tomoko Takahara, Satoshi Miyata and Takuro Nakamura. Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis., *Blood*, 116: 2768-2775, 2010, 査読有.

[学会発表] (計 6 件)

Takashi Yokoyama, Yohei Kannno, Tomoko Takahara, Yukari Yamazaki, Etsuro Ito, Yasuhide Hayashi and Takuro Nakamura. TRIB1 gain-of-function mutation in Down syndrome-related leukemia. 日米血液腫瘍セミナー (葉山), 2011 年 2 月 26 日

Takashi Yokoyama and Takuro Nakamura. Trib1 is an important adaptor that connects the MAP kinase pathway with C/EBP α in leukemogenesis. 第 69 回 日本癌学会総会 (大阪), 2010 年 9 月 23 日

横山隆志、中村卓郎、マウス白血病モデルを用いた Trib1 による白血病発症機構の解析 第 99 回 日本病理学会総会 (東京), 2010 年 4 月 29 日

Takashi Yokoyama and Takuro Nakamura. MEK1 dependent leukemogenic activity of Trib1., 8th Joint Conference of AACR and JCA (Hawaii), 2010 年 2 月 7 日

Takashi Yokoyama and Takuro Nakamura. MEK1 dependent leukemogenic activity of Trib1., 第 68 回 日本癌学会総会 (横浜), 2009 年 10 月 1 日

横山隆志, 中村卓郎. AML 原因遺伝子 Trib1 の機能における MEK1-ERK 経路の役割. 第 98 回 日本病理学会総会 (京都), 2009 年 5 月 1 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

所属機関ホームページ

<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/carcinogenesis/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 隆志 (YOKOYAMA TAKASHI)

財団法人癌研究会・癌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 :