

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790451

研究課題名（和文） Trib1/2ダブルノックアウトマウスを用いた造血幹細胞分化における機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of Trib1/2 double knockout mice on hematopoiesis

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

研究成果の概要（和文）：*Trib1* と *Trib2* は過剰発現により急性骨髄性白血病（AML）を誘導するが、私達はこの *Trib1* による白血病発症には MEK1 との直接結合を介した MAP キナーゼ経路の活性化と C/EBP $\alpha$  の分解が必須であることを報告している。一方で *Trib1*, *Trib2* 共にホモノックアウト（KO）マウスには重篤な異常が見られず、正常組織における機能は不明な点が多い。本研究ではマウス 13.5 日胚と成体組織における *Trib1/2* の発現を調べ、両者の発現は一部重複するが多くの組織において両者の発現分布が異なることを示した。また造血においては *Trib1* をノックアウトすると顆粒球分化の促進が見られ、C/EBP $\alpha$  とその標的である複数の分化制御遺伝子の発現が上昇することを明らかにした。このことから *Trib1* は正常造血において C/EBP $\alpha$  の分解を介してその標的遺伝子を制御し、顆粒球分化を調節している可能性が考えられた。また *Trib2* KO マウスでは分化の亢進は見られず、*Trib1/2* ダブル KO によっても *Trib1* シングル KO と同程度の顆粒球分化の促進しか見られなかった。正常骨髄における *Trib1* の mRNA を調べたところ *Trib2* の約 5 倍発現量が多いことから、顆粒球分化の調節においては *Trib1* がより優先的に機能していることが示された。

研究成果の概要（英文）：Overexpression of *Trib1* or *Trib2* induces acute myeloid leukemia (AML). We have previously reported that enhancement of MAP kinase pathway through interaction of *Trib1* with MEK1 and degradation of C/EBP $\alpha$  is required for leukemic activity of *Trib1*. However *Trib1* or *Trib2* KO (knockout) mice did not indicate severely abnormal phenotype and it is no clear the *Trib1/2* function in normal tissues. In this study, we demonstrated that *Trib1* and *Trib2* show different expression pattern in many tissues of E13.5 embryo and adult mice. In addition, bone marrow of *Trib1* KO mice indicated increase of segmented neutrophils, C/EBP $\alpha$  protein and its target genes that induce granulopoiesis. These results suggest that *Trib1* regulates granulopoiesis through degradation of C/EBP $\alpha$ . On the other hand, *Trib2* KO mice did not show abnormal differentiation and *Trib1/2* double conditional KO indicated the same level of granulopoiesis as *Trib1* single KO. In normal bone marrow cells, expression of *Trib1* is about 5 fold by compared with *Trib2*, indicating *Trib1* dominantly plays a key role in regulation of granulopoiesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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・実験病理学

キーワード：Trib1, Trib2, C/EBP $\alpha$ 、ノックアウトマウス、MAP キナーゼ経路、白血病

### 1. 研究開始当初の背景

Trib ファミリータンパク質 (Trib1-3) は種を超えて保存された pseudokinase ドメインを持ち、ハエの胚発生における細胞回転の制御やマウスにおける脂質の代謝、炎症反応など様々な機能をもつことが報告されている。Trib1 と Trib2 は過剰発現により AML を誘導するが、私達は Trib1 が MEK1 との直接結合を介した MAP キナーゼ経路を活性化と、顆粒球分化を誘導する C/EBP $\alpha$  の分解により AML を誘導することを明らかにしている。さらに私達は *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 gain-of-function mutation である可能性が考えられる somatic mutation を同定した。一方でこれまでに他の研究グループによって Trib1-3 それぞれのノックアウト (KO) マウスが作製されているがいずれも重篤な異常は見られず、正常組織や造血における機能は不明な点が多い。本研究では骨髄細胞に対する作用と C/EBP $\alpha$  分解において機能が類似している Trib1/Trib2 のダブル KO マウスの作製と解析をおこない、C/EBP $\alpha$  の制御を介した造血幹細胞分化の制御因子として機能する可能性について検討した。

### 2. 研究の目的

(1) Trib1 および Trib2 シングル KO マウスにおいて発達段階と成体組織における異常の有無と発現について調べ、正常組織における機能について検討する。

(2) Trib1, Trib2 シングル KO および造血器特異的に Trib1/2 を欠失させた時の成体造血機能への影響を調べる。これらの異常が Trib1/2 欠失による MAP キナーゼ経路や C/EBP の制御異常によるものであるかを検討し、Trib1/2 が造血幹細胞分化の制御因子であることを解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) KO マウスの作製

Trib1 の第 2、第 3 エクソンのコーディング領域を loxP 配列で挟むターゲティングベクターを構築し、Trib1<sup>flox/flox</sup> マウスを作製した。この Trib1<sup>flox/flox</sup> マウスと Mx-1-Cre トランスジェニックマウスとを交配させ、polyI-polyC 投与により造血器特異的に Trib1 ノックアウトの誘導が可能な Trib1<sup>flox/flox</sup>MxCre マウスを得た。さらに西中村隆一教授ら (熊本大学発生医学研究所) より供与された Trib2 KO マウスとの交配により、Trib1 を Trib1<sup>flox/flox</sup> Trib2<sup>ko/ko</sup> Mx-1-Cre マウスの作製した。

#### (2) KO マウスを用いた Trib1、Trib2 の発現解析

Trib1、Trib2 の各ホモ KO マウスの成体組織および 13.5 日胚の凍結切片を作製し、LacZ 発現カセットを利用した  $\beta$  ガラクトシダーゼ染色により Trib1 と Trib2 の発現を調べた。

#### (3) 造血幹細胞分化における Trib1、Trib2 の機能解析

Trib1、Trib2 および Trib1/2 コンディショナル KO マウスの骨髄細胞を採取してギムザ染色による形態観察をおこない、またフローサイトメーターを用いて各分化段階における細胞の割合を調べた。各 KO マウス骨髄における C/EBP $\alpha$  のタンパク質量と顆粒球分化関連遺伝子の発現を調べた。またそれぞれのシングル KO マウスの造血幹細胞をメチルセルロース培地中で培養し、分化への影響について調べた。

### 4. 研究成果

(1) *Trib1*、*Trib2* のマウス 13.5 日胚および成体組織における発現を調べたところ、肝細胞や膵臓ラ氏島  $\beta$  細胞、皮膚の基底層や毛嚢では Trib1 のみが発現しており、他に小脳プルキニエ細胞、腎尿細管のヘンレ係蹄、末梢

の気管支上皮、消化管上皮、血管内皮などで *Trib1* の強い発現が見られた。一方で *Trib2* は神経細胞と一部のグリア細胞、ヘンレ係蹄以外の尿細管、糸球体、中枢側の気管支上皮、消化管筋層、血管平滑筋などで強い発現が見られ、また心筋と骨格筋では *Trib1/2* のどちらも発現していた。本研究においても *Trib1*、*Trib2* ホモ KO マウスはいずれも重篤な異常は見られなかった。

(2) *Trib1* ホモ KO マウスの骨髄細胞を採取してギムザ染色し、形態観察を行ったところ分葉核白血球の割合が増加していた。さらに各分化段階における骨髄細胞の割合をセルソーターで調べた結果 granulocyte (*Mac-1*<sup>+</sup>, *Gr-1*<sup>high</sup>) の割合が増加していた。また *Trib1* コンディショナル KO マウスにおいて骨髄細胞特異的に *Trib1* を KO させた場合も同様に顆粒球分化の亢進が見られた。さらに *Trib1* KO マウスの骨髄細胞において C/EBP $\alpha$  タンパク質の増加が見られ、また C/EBP $\alpha$  の標的遺伝子であり顆粒球分化を誘導する遺伝子 *IL6r*, *Mpo* および *Gsf3r* の発現上昇が見られた。このことから *Trib1* は正常造血においても過剰発現と同様に C/EBP $\alpha$  を分解し、C/EBP $\alpha$  のタンパク質量を調節することで顆粒球分化を制御していることが示唆された。一方 *Trib2* ホモ KO マウスではこれらの異常は見られなかった。次に *Trib1*<sup>flox/flox</sup>*Trib2*<sup>ko/ko</sup>*Mx-1-Cre* マウスで骨髄細胞特異的に *Trib1* を欠失させて *Trib1/2* ダブル KO による影響を調べたところ、*Trib1* シングル KO と同程度の顆粒球分化促進が見られた。正常骨髄細胞における *Trib1* と *Trib2* の発現量を RT-qPCR で比較したところ、*Trib1* は *Trib2* の約 5 倍発現が高いことがわかった。このため *Trib2* KO マウスでは *Trib1* による機能補完のため分化促進がおこらず、また *Trib1/2* ダブル KO によっても相乗効果が見られないことが考えられた。一方顆粒球分化以外の各分化段階における細胞の割合は *Trib1*、*Trib2* および *Trib1/2* KO マウスで変化は見られず、また各 KO マウスの骨髄細胞を用いた colony formation assay においても分化の異常は見られなかった。

(3) 骨髄細胞における *Trib1* による MAP キナーゼ経路の制御機能を調べるため、野生型およ

び *Trib1* ホモ KO マウスの骨髄細胞に *Hoxa9* を導入して不死化細胞株を樹立した。これらの細胞を IL3 で刺激し 2-90 分後の ERK1/2 のリン酸化を調べたが、*Trib1* KO による影響は見られなかった。

## 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 1 件)

Takashi Yokoyama, Tsutomu Toki, Yoshihiro Aoki, Rika Kanazaki, Myoung-ja Park, Yohei Kanno, Tomoko Takahara, Yukari Yamazaki, Etsuro Ito, Yasuhide Hayashi and Takuro Nakamura. Identification of TRIB1 R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. *Blood* (2012), 119: 2608-2611, 10.1182/blood-2010-12-324806, 査読有.

[学会発表](計 7 件)

横山隆志, 中武真由香, 菅野陽平, 高原智子, 山崎ゆかり, 堤修一, 油谷浩幸, 中村卓郎. *Syt11* は AML 発症における *Meis1* の新規標的遺伝子であり *Hoxa9* に協調作用を示す. 第 71 回 日本癌学会学術総会 (札幌). 2012 年 09 月 20 日

Takashi Yokoyama, Mayuka Nakatake, Yohei Kanno, Tomoko Takahara, Yukari Yamazaki, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani and Takuro Nakamura. *Syt11* is a novel *Meis1* target and a cooperative partner of *Hoxa9* in AML development. 9th International Workshop on Molecular Aspects of Myeloid Stem Cell Development and Leukemia (アメリカ合衆国オハイオ州シンシナティ). 2012 年 05 月 07 日

横山隆志, 山崎ゆかり, 菅野陽平, 高原智子, 西中村 隆一, 中村卓郎. 白血病原因遺伝子 *Trib1/2* の発現と造血における役割. 第 101 回 日本病理学会総会 (新宿). 2012 年 04 月 27 日

Takashi Yokoyama, Tsutomu Toki, Yoshihiro Aoki, Rika Kanazaki, Myoung-ja Park, Etsuro Ito, Yasuhide Hayashi and Takuro Nakamura. TRIB1 gain-of-function mutation in Down syndrome-related leukemia. 第70回 日本癌学会学術総会 (名古屋). 2011年10月5日

横山隆志, 菅野陽平, 山崎ゆかり, 高原智子, 宮田敏, 林泰秀, 伊藤悦朗, 中村卓郎. Trib1による白血病発症機構. 平成23年度 文科省科研費補助金 新学術領域「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」がん若手研究者ワークショップ (蓼科). 2011年9月3日

横山隆志, 菅野陽平, 山崎ゆかり, 高原智子, 宮田敏, 林泰秀, 伊藤悦朗, 中村卓郎. Trib1によるMEK1/ERK経路とC/EBP $\alpha$ 制御を介した白血病発症機構の解明. 第7回 血液学若手研究者勉強会 (麒麟塾) (東京). 2011年6月4日

横山隆志, 中村卓郎. ダウン症候群関連急性巨核球性白血病におけるTRIB1変異の同定. 第100回 日本病理学会総会 (横浜). 2011年4月29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)

[その他]

ホームページ等

<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)

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