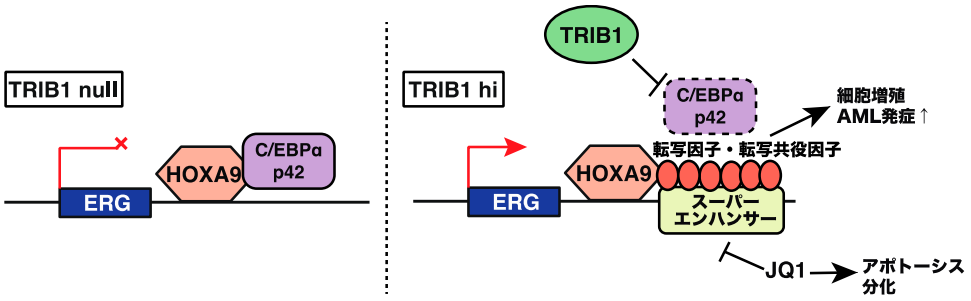
170　AMLにおけるTRIB1のスーパーエンハンサー制御	芳野　聖子

【目的】急性骨髄性白血病（AML）の発症と悪性化において、発がん性転写因子は大きな役割を担っている。中でもHOXA9の発現亢進とC/EBPαの機能欠失変異は、原因遺伝子や予後不良因子として極めて重要である。Pseudokinase TRIB1は、AML原因遺伝子かつHOXA9協調遺伝子として同定された。TRIB1による白血病誘導機構として、MEK1／ERK経路の活性化促進と、C/EBPαの分解誘導が挙げられる。TRIB1は核に優位に局在することから、クロマチンとの親和性が示唆されるが、TRIB1 と HOXA9 との協調作用の本態は不明であった。一方で、AML において、C/EBPαとHOXA9がクロマチン上でしばしば共局在していることが報告され、TRIB1がHOXA9の転写調節機構に影響を及ぼしている可能性が予想された。

【方法】TRIB1の発現量の違いによる白血病細胞の性質および遺伝子発現の比較を行うため、TRIB1 KOマウス由来の造血細胞にHOXA9を導入して不死化細胞を樹立し（TRIB1 null）、さらにTRIB1を強制発現した細胞（TRIB1 hi）を樹立した。TRIB1 nullおよびTRIB1 hi細胞について、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。また、FLAG（HOXA9）、C/EBPα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-seqを行い、ROSE programにより、スーパーエンハンサーの同定を行った。続いて、スーパーエンハンサーの構成因子であるBET系ブロモドメインタンパクBRD4の阻害剤（JQ1）への感受性を、*in vitro*および*in vivo*で検証した。

【結果】TRIB1 null と hi 細胞の性状の比較から，TRIB1を発現する細胞では細胞増殖と白血病発症が促進されるとともに、遺伝子発現プロファイルの大規模な変化が認められた。ChIP-seqの解析から、この変化の少なくとも一部はTRIB1 が引き起こしたスーパーエンハンサーの改築によるものと考えられた。スーパーエンハンサーは、がん細胞の特性を規定し、増殖や未分化性などのがんの悪性化に関与している。続いて、変動するスーパーエンハンサーの近傍遺伝子の中で、造血に重要な役割を担うERGに着目した。解析の結果、TRIB1はC/EBPαの分解を介して、ERGの造血器特異的スーパーエンハンサーを増強し、ERG の発現を亢進することが明らかとなった。スーパーエンハンサー上には多数の転写因子に加えて、BRD4などBETファミリータンパクが結合し複合体を形成する。スーパーエンハンサーを標的とするBRD4の阻害薬JQ1により、ERGを初めとするTRIB1／HOXA9の標的遺伝子の発現低下と白血病の増殖抑制が認められた。この変化はヒト急性骨髄性白血病細胞でも共通に認められた。本研究により、Pseudokinase TRIB1がHOXA9と協調しERGの発現制御することを明らかにした。さらに本成果から、TRIB1とスーパーエンハンサーを標的とする難治性急性骨髄性白血病に対する治療が期待される。

TRIB1によるエンハンサーリプログラミング



170. AML における TRIB1 のスーパーエンハンサー制御

芳野　聖子

名古屋大学 大学院医学系研究科 分子腫瘍学

Key words : TRIB1, 白血病, スーパーエンハンサー, ERG, JQ1

緒　言

ヒト急性骨髄性白血病（AML）の発症と悪性化において発がん性転写因子は大きな役割を担っている。中でもHOXA9とC/EBPαは、原因遺伝子や予後不良因子として極めて重要である。例えばHOXA9は、①正常核型で*NPM1*遺伝子変異が見られるグループのほぼ全例で高発現し、②第11染色体転座を有するMLL関連AMLではMLL融合遺伝子の直接の標的になり、③HOXA9高発現はAMLの不良な予後と強く相関し、④t (7;11) 転座でNUP98と融合しAML原因遺伝子となっている。また、C/EBPαは好中球分化誘導能と強力な細胞周期抑制能を持ち、機能欠失型変異がAMLの約10%で認められる［1］。以上のAML臨床例の状況を踏まえると、HOXA9とC/EBPα双方の機能を修飾するAML原因遺伝子TRIB1の存在が脚光を浴びる。

Pseudokinase TRIB1は、AML原因遺伝子かつHOXA9協調遺伝子として同定された［2］。TRIB1による白血病誘導の分子機構としては、MEK1との結合によるERKシグナルの亢進と遷延化と、C/EBPαに対する分解誘導が挙げられる［3］。すなわち、TRIB1の強力な発がん活性は、シグナル伝達および転写調節系に同時に異常を付与することにある。TRIB1は核に優位に局在することから、クロマチンとの親和性が示唆される。一方で、TRIB1とHOXA9との協調作用の本態は不明であった。

近年、AMLにおいてHOXA9とC/EBPαのゲノム上におけるDNA結合部位がしばしば共存していることが報告された［4］。本研究では、TRIB1によるHOXA9とC/EBPαの機能制御やエピゲノム修飾に及ぼす影響を明らかにし、AMLの悪性化に関わる新たな知見を得ることを目的とした［5］。

方　法

1. 細胞株と培養

TRIB1の発現量の違いによる白血病細胞の性質および遺伝子発現の比較を行うため、TRIB1 KOマウス由来の造血細胞にHOXA9を導入して不死化細胞を樹立し（TRIB1 null : TRIB1 KO／HOXA9）、さらにTRIB1を強制発現した細胞（TRIB1 hi : TRIB1 過剰発現／HOXA9）を樹立した。ヒト骨髄性白血病細胞株には、KU812、P39およびHL-60を用いて、JQ1処理による細胞増殖への影響とTRIB1／HOXA9標的遺伝子の発現を観察した。さらに、TRIB1のノックダウン細胞を作製し、細胞増殖の影響とTRIB1／HOXA9標的遺伝子の発現変化を観察した。

2. 遺伝子発現解析

TRIB1 nullおよびTRIB1 hi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。

3. クロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-seq）

TRIB1 nullおよびTRIB1 hi細胞について、FLAG（HOXA9）、C/EBPα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/EBPα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。

4. マウス骨髄移植と薬剤投与

骨髄移植はマウスに 4.0 Gy の放射線を照射し、TRIB1 hi 細胞を 1×10^7 個静脈内注射した。骨髄移植して 1 週間後、JQ1（50 mg/kg）を週 5 回、3 週間マウスに腹腔内投与した。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。

結果および考察

1. TRIB1 は C/EBPα の分解を介して、HOXA9 が結合するスーパーエンハンサーを修飾する

まず我々は、TRIB1 の発現量の異なる HOXA9 導入不死化細胞として TRIB1 null（TRIB1 KO／HOXA9）および TRIB1 hi（TRIB1 過剰発現／HOXA9）を、*TRIB1* 欠損マウスの造血細胞から樹立した。TRIB1 null と hi 細胞の性状の比較から、TRIB1 を発現する細胞では増殖と移植による白血病発症が促進され、遺伝子発現プロファイルにも大きな変化が認められ、HOXA9 による転写制御プログラムがダイナミックに変化することが示唆された。そこで、HOXA9、C/EBPα および H3K27ac に対する ChIP-seq 解析を行った結果、HOXA9 や C/EBPα が結合する領域にあるスーパーエンハンサーが TRIB1 の発現により変動していることを見出した。変動する幾つかの領域の中で、我々は、造血に重要な役割を担っている *ERG* 遺伝子に注目した。解析の結果、TRIB1 は C/EBPα p42 アイソフォームの分解を介して ERG の造血特異的+85 スーパーエンハンサーを増強し、ERG の発現を亢進させることが明らかになった（図 1）。さらに、+85 エンハンサーの HOXA9 結合配列を CRISPR-Cas9 システムを用いて消失させたところ、ERG の発現が著しく減少したことから、+85 エンハンサー領域の HOXA9 結合が *ERG* の発現に重要であることが明らかになった。

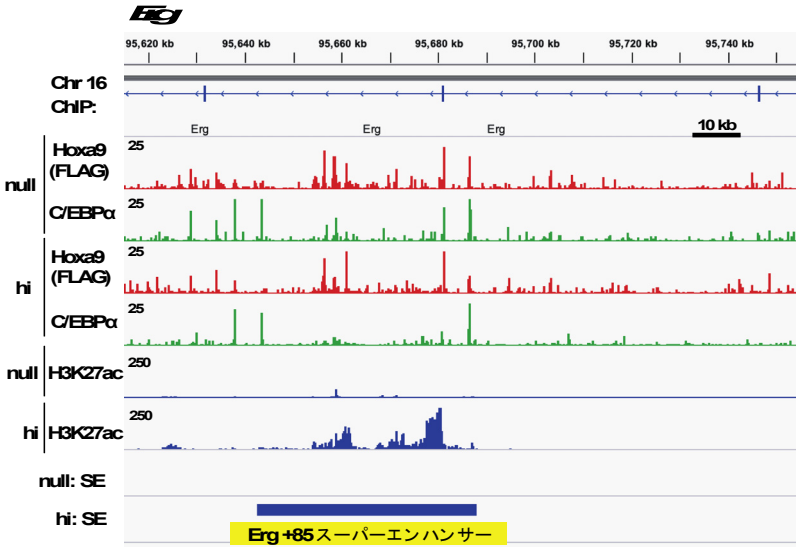


図 1. ERG +85 エンハンサーにおける HOXA9、C/EBPα および H3K27ac の結合
TRIB1 null および hi 細胞における ERG+85 スーパーエンハンサー領域の HOXA9、C/EBPα および H3K27ac の結合を ChIP-seq 法により解析した。TRIB1 hi 細胞では、H3K27ac の著しい集積が認められ、スーパーエンハンサーが検出された。

2. ERG は HOXA9 と TRIB1 の標的遺伝子として白血病の増殖を促進する

ERG は、ETS ファミリーに属する転写因子であり、造血や血管新生に必要であるだけでなく、白血病の原因遺伝子としても重要である。TRIB1 hi 細胞において、ERG をノックダウンすると、増殖が阻害された。逆に、TRIB1 null 細胞において ERG を強発現させると白血病細胞の増殖は促進された。一方、ヒト急性骨髄性白血病細胞株の一部でも HOXA9 と TRIB1 および ERG の発現レベルは相関を示し、*TRIB1* のノックダウンにより *ERG* の発現が抑制されることが確認された。

3. BRD4 阻害薬 JQ1 は HOXA9／TRIB1 経路を標的として白血病の増殖を抑制する

続いて、スーパーエンハンサーに結合しエンハンサー活性や転写伸長を制御する BRD4 の阻害薬 JQ1 を用いて、TRIB1 が増強したスーパーエンハンサーに対する阻害効果を調べた。JQ1 の処理により TRIB1 と HOXA9 に制御される *ERG* を初めとする標的遺伝子の発現は顕著に抑制され、細胞増殖が抑制された（図 2）。また、細胞分化や細胞死も誘導されることが明らかとなった。さらに、TRIB1 hi 細胞を骨髄移植されたマウスに JQ1 を投与すると、白血病発症の抑制が認められ、治療薬としての効果が示された（図 2）。JQ1 の効果は TRIB1 と HOXA9 の発現が亢進しているヒト白血病細胞でも同様に認められた。これらの結果から、pseudokinase TRIB1 が HOXA9 と協調し *ERG* の発現制御することが今回初めて明らかになり、HOXA9／TRIB1／ERG 経路はヒト白血病細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが示された（図 3）[5]。

さらに、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 α を含む 6 個の転写因子を同定した。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のかどうかを検証する。

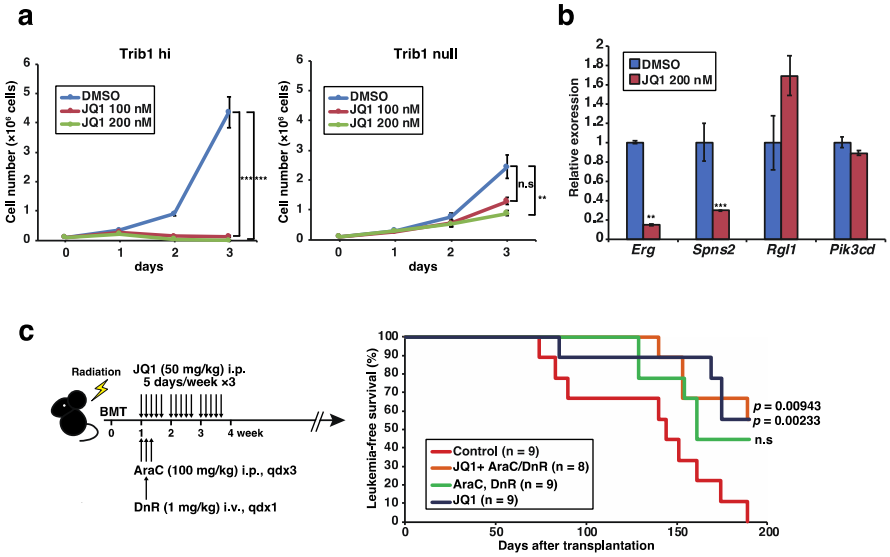


図 2. JQ1 は TRIB1 依存的に細胞増殖を抑制し、白血病発症を抑制する

a) TRIB1 hi および TRIB1 null 細胞の JQI への感受性を、細胞増殖試験により検証した。エラーバーは標準偏差を示す（n=3）。データは t 検定で解析した。**p<0.01、***p<0.001。

b) JQ1 処理による TRIB1／HOXA9 標的遺伝子群の発現変化を定量 PCR により測定した。エラーバーは標準偏差を示す（n=3）。データは t 検定で解析した。**p<0.01、***p<0.001。

c) TRIB1 hi 細胞を骨髄移植した AML 発症マウスへの JQ1 の投与解析。実験のスキーム（左）とカプラン・マイヤー法による生存曲線（右）。AraC : cytarabine、DnR : daunorubicin、i.p. : intraperitoneal injection、i.v. : intravenous injection。

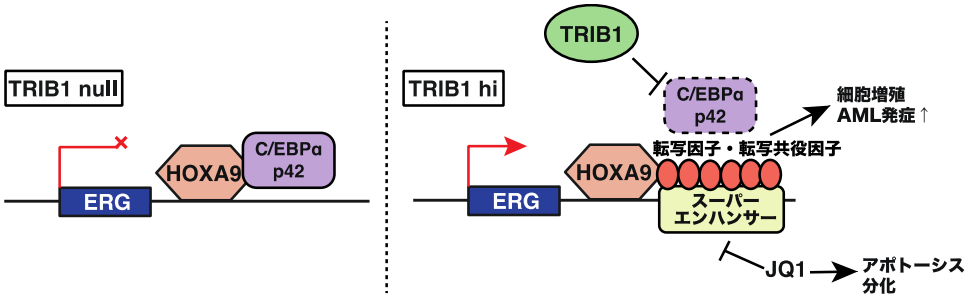


図 3. TRIB1 によるエンハンサーリプログラミング

左）TRIB1 の発現が低い場合、HOXA9 と C/EBP α が DNA 上で共存し *ERG* の発現は低下したままの状態を保つ。

右）TRIB1 が過剰発現すると、C/EBP α が分解されてスーパーエンハンサーが形成され、*ERG* の発現が亢進し白血病が悪性化する。JQ1 はスーパーエンハンサー機能を抑制することで、白血病細胞の細胞死や分化を誘導する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、公益財団法人がん研究会がん研究所発がん研究部の中村卓郎部長である。本研究の遂行にご協力いただいた公益財団法人がん研究会がん研究所発がん研究部の皆様ならびに、本研究のご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Porse BT, Pedersen TA, Xu X, Lindberg B, Wewer UM, Friis-Hansen L, Nerlov C. E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. Cell. 2001 Oct 19;107(2):247-58. PMID: 11672531. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00516-5.

2) Jin G, Yamazaki Y, Takuwa M, Takahara T, Kaneko K, Kuwata T, Miyata S, Nakamura T. Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. Blood. 2007 May 1;109(9):3998-4005. Epub 2007 Jan 16. PMID: 17227832. doi: 10.1182/blood-2006-08-041202.

3) Yokoyama T, Kanno Y, Yamazaki Y, Takahara T, Miyata S, Nakamura T. Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis. Blood. 2010 Oct 14;116(15):2768-75. Epub 2010 Jul 7. PMID: 20610816. doi: 10.1182/blood-2009-10-246264.

4) Collins C, Wang J, Miao H, Bronstein J, Nawer H, Xu T, Figueroa M, Muntean AG, Hess JL. C/EBPα is an essential collaborator in Hoxa9/Meis1-mediated leukemogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jul 8;111(27):9899-904. Epub 2014 Jun 23. PMID: 24958854. doi: 10.1073/pnas.1402238111.

5) Yoshino S, Yokoyama T, Sunami Y, Takahara T, Nakamura A, Yamazaki Y, Tsutsumi S, Aburatani H, Nakamura T. Trib1 promotes acute myeloid leukemia progression by modulating the transcriptional programs of Hoxa9. Blood. 2021 Jan 7;137(1):75-88. PMID: 32730594. doi: 10.1182/blood.2019004586.