

令和元年6月25日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14996

研究課題名(和文)成人T細胞白血病(ATL)に対するレナリドミドの作用機序の解明

研究課題名(英文)An investigation of the molecular mechanisms of action of lenalidomide in adult T-cell leukemia (ATL)

研究代表者

山本 淳一 (Yamamoto, Junichi)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：40748472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： サリドマイド誘導体であるレナリドミドは成人T細胞白血病(adult T-cell leukemia / lymphoma: ATL)の治療薬として承認を受けたが、その抗ATL作用の作用機序は全く分かっていない。

本研究はレナリドミドの直接の標的分子であるCRBNを起点とし、レナリドミドおよび抗ATL作用を持つレナリドミド誘導体依存的なCRBNの基質候補の探索を行った。その結果、ATL細胞株におけるレナリドミド誘導体依存的なCRBNの新規基質を12種類同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本には100万人を超えるHTLV-1キャリアが存在し、毎年1000人近くの患者がATLによって亡くなっており、ATLに対する有効な治療法の確立は我が国にとって急務といえる。

本研究でATLに有効な治療薬であるレナリドミドの標的候補が同定されたことによって、その作用機序の解明が進み、より効果的な治療薬の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Lenalidomide, a thalidomide derivative, is approved for adult T-cell leukemia / lymphoma (ATL) in Japan. However, the underlying mechanisms are not clear. In this study, we attempted to identify novel substrates of CRBN, a direct target of lenalidomide, in ATL cell lines. As a result, we identified 12 novel substrates of CRBN that were specifically degraded by treatment of lenalidomide or lenalidomide derivatives in ATL cell line.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん 成人T細胞白血病 IMiDs

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia / lymphoma: ATL) は、ヒト T 細胞性白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type-I: HTLV-1) を原因ウイルスとする、極めて予後不良の CD4 陽性 T 細胞の悪性腫瘍である。我が国には 100 万人を超える HTLV-1 キャリアがいると考えられており、その中の約 5% が非常に長い潜伏感染期を経て ATL を発症する。一旦発症すると、ほとんどの患者は高度な薬剤抵抗性を示し、再発又は病勢の進行を阻止することができずに 2 年程度で死に至る。現在の所、有効な治療法が確立されておらず、新たな薬剤の登場が待ち望まれている。

サリドマイドやその誘導体であるレナリドミド、ポマリドミドは Immunomodulatory drugs (IMiDs) と呼ばれ、多発性骨髄腫を含む B 細胞の悪性腫瘍に著効であることが知られている。ごく最近、レナリドミドが本邦において行われた ATL 患者を対象とした臨床試験で優れた成績をおさめたことから、ATL に対する有効な新規薬剤として承認を受けた。しかしながら、現在の所、ATL に対するレナリドミドの薬効の作用機序は全く分かっていない。

本研究に先立つ我々の予備実験から、レナリドミドの抗 ATL 作用は培養細胞において再現可能であること、また次世代 IMiDs (レナリドミド誘導体) がレナリドミドを遥かに凌ぐ抗 ATL 作用を示すこと (図 1) が示唆されたことから、培養細胞系における標的タンパク質の探索によって、全く未知であったレナリドミドの抗 ATL 作用の作用機序を明らかにし、より効果的な ATL の治療薬の開発に繋がる知見が得られることが示唆された。

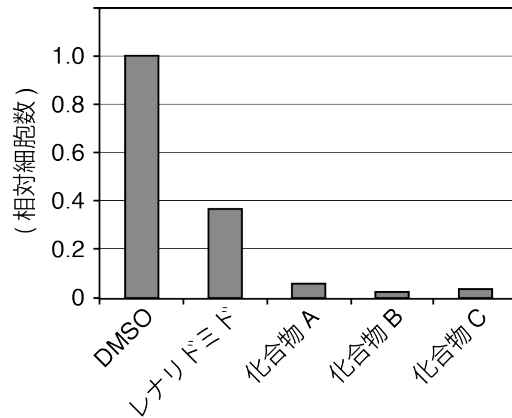


図 1: 次世代 IMiDs の抗 ATL 作用
(全て 2 μ M, 8 日処理)

2. 研究の目的

本研究では、IMiDs の直接の標的分子である E3 ユビキチンリガーゼ複合体の基質認識サブユニット Celeblon (CRBN) を起点とし、レナリドミドおよび抗 ATL 作用を持つ次世代 IMiDs に依存的な CRBN の新規基質候補の探索および下流の分子メカニズムの解析を行い、ATL に対する IMiDs の薬効の作用機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ATL 細胞株の細胞抽出液に含まれる IMiDs 特異的な CRBN の相互作用因子の探索

ATL 細胞株抽出液から、免疫沈降法と質量分析によって IMiDs 特異的な CRBN の相互作用因子を網羅的に探索する。化合物としてレナリドミドを、誘導体の中で最も抗 ATL 作用の強かった化合物 C を用いる。

(2) UbiScan による ATL 細胞株に含まれる IMiDs 依存的な CRBN の基質の探索

(1) で行う相互作用因子の探索では非常に多くのタンパク質が同定される可能性がある。その場合、その中から、IMiDs の抗 ATL 作用に関与する真の標的を絞り込む必要がある。CRBN はユビキチンリガーゼ複合体の基質認識サブユニットであることから、真の標的は IMiDs 処理によってユビキチン化が促進又は阻害される可能性が高い。UbiScan は Cell Signaling Technology 社が提供している、ユビキチン化タンパク質のプロテオーム解析のプラットフォームであり、ユビキチン化部位や基質の探索研究において標準的な実験手法とみなされている。そこで、本研究では(1)と並行して、UbiScan によるユビキチン化タンパク質のプロテオーム解析を行う。

(3) 同定された基質候補の validation

(1) および(2)によって同定された IMiDs 依存的な CRBN の基質候補について、ATL 細胞株を IMiDs 処理し、その分解をウエスタンブロットングにより確認する。

(4) 標的タンパク質を介したレナリドミドの抗 ATL 作用の分子メカニズムの解析

IMiDs 処理によって分解が確認された標的候補について、下流の詳細な分子メカニズムを解析する。標的遺伝子のノックダウンによる、ATL 細胞株の増殖の変化。標的遺伝子のノックダウンによる IMiDs 感受性の変化、等を解析する。

4. 研究成果

(1) ATL 細胞株の細胞抽出液に含まれる IMiDs 特異的な CRBN の相互作用因子の同定

ATL 細胞株の一つである ED-40515 細胞抽出液から、免疫沈降法と質量分析によって IMiDs 特異的な CRBN の相互作用因子の探索を行った。IMiDs としてレナリドミドと次世代 IMiDs の中で最も抗 ATL 作用が強かった化合物 (化合物 C) を使用した (図 1)。結果として、質量分析により同定された多数のタンパク質の中で、IMiDs 添加によって CRBN との結合が有意に変化したと判断されたタンパク質は 39 種類であった (図 2)。

(2) UbiScan による ATL 細胞株に含まれる IMiDs 依存的な CRBN の基質の同定

UbiScan は、サンプル調製から外部業者に委託すると極めて高額になるため、質量分析以前の全行程を研究室で行う事とした。そのための各種条件検討を行ったものの、予備実験の結果から、質量分析以前の全行程を自前で行った場合には、十分に信頼できる結果を得ることは困難であることが示唆された。UbiScan のサンプル調製および解析を受け入れている委託業者とディスカッションした所、専門の設備とスタッフによってサンプル調製がなされない場合には、解釈に値する十分なクオリティの結果を得られないことが多いとの回答を得たために、残念ながら本研究では予算内において実現することは困難であると判断した。

(3) ATL 細胞株における IMiDs 特異的な CRBN の標的候補の絞り込み

UbiScan による候補因子の絞り込みが出来なかったため、並行して行っていた多発性骨髄腫細胞株を用いた IMiDs 特異的な CRBN の標的候補の解析結果を利用して、候補因子の絞り込みを試みた。ATL 細胞株に特異的であった候補因子、及び MM 細胞でも同定された中で未報告の因子に注目し、その中から結合の確からしさおよび既知の機能に基づき、25 の候補因子について詳細に解析することにした。

(4) ATL 細胞株における標的候補の IMiDs による分解の検証

解析した 25 の候補因子の中で 12 の標的候補について ATL 細胞株において本研究で検討したいずれかの IMiDs 処理によって分解を観察することができた (一部を図 3 に示す)。しかし、本研究で行った条件においては、レナリドミドによって顕著に分解された標的候補は 3 つに留まった。

上述のように、本研究によって多くの IMiDs 特異的な CRBN の新規標的の同定に成功した。現在、その分子メカニズムについて詳細な解析を進めている。具体的には、各標的候補のノックダウンが ATL 細胞株の増殖に及ぼす影響の解析、各標的候補のノックダウンが ATL 細胞株の IMiDs 感受性に与える影響の解析、RNA-sequence によって各因子の下流のパスウェイの解析および IMiDs 処理との比較を進めている。近い将来、投稿論文として国際学術誌に投稿する予定である。

IMiDs	—	—	LEN	化合物 C
Flag-HA-CRBN	—	+	+	+
ED-40515 lysate	+	+	+	+

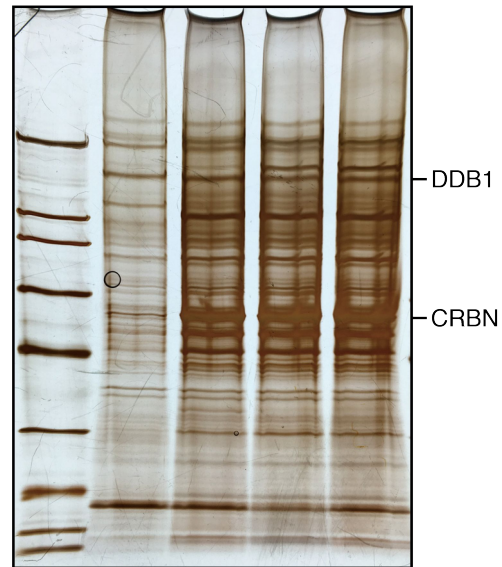


図 2: レナリドミドおよび化合物 C 依存的な CRBN 相互作用因子の探索

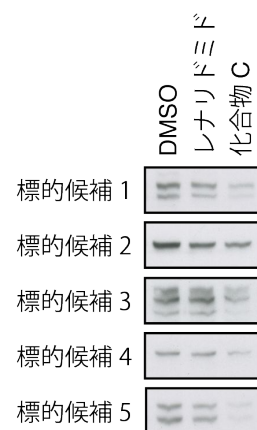


図 3: IMiDs による新規標的候補の分解 (1 μM, 3 日処理)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。