

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16378

研究課題名（和文）急性前骨髄球性白血病（APL）に対するセレブロンモジュレーターの作用機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of action of cereblon modulators on acute promyelocytic leukemia (APL)

研究代表者

清水 誠之 (Shimizu, Nobuyuki)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30817143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、多発性骨髄腫の治療薬として承認されているポマリドミドの適応拡大を目指した。セレブロンは、セレブロンモジュレーターと総称される薬剤が結合し、本来とは異なる基質（ネオ基質）を認識・分解する特殊なタンパク質である。研究代表者は、セレブロンモジュレーターのひとつ、ポマリドミドの新しいネオ基質を発見していた。ネオ基質をコードする遺伝子は、血液がんのひとつ急性前骨髄球性白血病（APL）に関わっている。解析の結果、ポマリドミドはセレブロン依存的に新規ネオ基質の分解を誘導し、APLに対する抗がん作用を示した。本成果は、ポマリドミドの新規ネオ基質を起点にしたAPLの新しい治療法を提示するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポマリドミドは、再発性の多発性骨髄腫に対して既に承認された薬である。本研究結果により、ポマリドミドが急性前骨髄球性白血病（APL）の治療薬へと適応追加されることが期待できる。また、その臨床試験に対するコストと時間が大幅に削減できる点からも、社会的な波及効果は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to expand the indication of pomalidomide, which is approved for the treatment of multiple myeloma. Cereblon (CRBN) is a unique protein that binds to and recognizes and degrades unusual substrates (neo-substrates), collectively known as cereblon modulators. I had discovered a new neo-substrate for one of the cereblon modulators, pomalidomide. The gene encoding the neo-substrate has been implicated in acute promyelocytic leukemia (APL), a blood cancer. The analysis showed that pomalidomide induced the degradation of the new neo-substrate in a cereblon-dependent manner and had an anticancer effect on APL. These results suggest a new therapeutic approach for APL based on the novel neo-substrate of pomalidomide.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：セレブロン（CRBN） E3ユビキチンリガーゼ サリドマイド レナリドミド ポマリドミド ネオ基質
融合遺伝子 急性前骨髄球性白血病（APL）

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今から約 50 年前、鎮静剤として登場したサリドマイドは、服用した妊婦の子どもに四肢の形成異常や精神遅滞など深刻な副作用が生じることが明らかにされ、いったんは市場から撤廃を余儀なくされた。しかし、現在ではサリドマイドが、血液がんの一種である多発性骨髄腫に対して有効な作用を示すことが判明し、再び評価されるに至っている。日本では、2008 年にサリドマイドが再認可され、世界各国では副作用のない強力な抗がん作用をもつサリドマイドをベースにした誘導体(類似した化合物)の開発が続けられている。サリドマイドの中心的な標的因子は、E3 ユビキチンリガーゼのセレブロン(celebron, CRBN)であることが分かっている。一方、セレブロンはサリドマイド誘導体の種類に応じて、異なる別のタンパク質(ネオ基質)を認識して分解する。ゆえにサリドマイド誘導体は別名セレブロンモジュレーターとも呼ばれる。そのなかで、多発性骨髄腫に対し、サリドマイドより強力な抗がん作用をもつ誘導体ポマリドミドが、米国セルジーン社(現プリストルマイヤーズ)により開発され、日本では 2015 年に承認されている。セレブロンモジュレーターのひとつレナリドミドは、多発性骨髄腫、骨髄異形症候群、マンツル細胞リンパ腫に対し、臨床的に改善効果が確認されている。レナリドミドは、多発性骨髄腫の生存に必須の転写因子 Ikaros と Aiolos をネオ基質とし、骨髄異形成症候群に対してはカゼインキナーゼ 1 (CK1) を標的としていることが明らかにされている。一方で、ポマリドミドは再発した多発性骨髄腫に対して適応されるにとどまっている。そこで、研究代表者は、ネオ基質をベースにしたポマリドミド医薬品の適応拡大を図った。そして、ポマリドミド存在下において、さまざまな細胞抽出液からセレブロンに結合するネオ基質を探索した結果、急性前骨髄球性白血病の発症に関与する新しい候補となるネオ基質(X)を発見していた。白血病のひとつ、急性前骨髄球性白血病の発症の病因として、ネオ基質(X)をコードする遺伝子と APL1 遺伝子の転座によって生じる融合遺伝子が関与している。

2. 研究の目的

薬剤ポマリドミドにおけるセレブロンの新しいネオ基質(X)をベースに、急性前骨髄球性白血病(APL)の原因となる融合基質(X-APL1)の分解誘導メカニズムを生化学的に明らかにする。さらに、ポマリドミドによる X-APL1 の分解に伴う抗腫瘍効果を検証し、急性前骨髄球性白血病に対する新しい治療法の確立をめざした。

3. 研究の方法

候補の基質(X)と融合基質(X-APL1)について、ポマリドミドを生細胞に処理した際、XとX-APL1の分解が生じるかを検証した。また、XとX-APL1がユビキチンプロテアソーム系により分解されるかを確かめるため、プロテアソーム阻害剤を用いて、分解やユビキチン化の有無をウェスタンブロットにより解析した。さらに、CRISPR/Cas9により、セレブロンをノックアウトした細胞株を樹立し、XとX-APL1の分解がセレブロンを介しているかを解析した。続いて、ポマリドミドセレブロン依存的に結合するXとX-APL1のアミノ酸部位を決定するため、さまざまな変異体を作製し、免疫沈降法によりセレブロンと基質の結合能について検証を行った。この結果をもとに、非結合型の変異体がセレブロン-ポマリドミドによる分解に耐性を示すかを確認した。最後に、X-APL1を発現するU937細胞において、ポマリドミド依存的に細胞の増殖が抑制されるかを生細胞数測定試薬SFにより検証した。また、レンチウイルスベクターによりX-APL1非結合型の変異体を発現するU937細胞を樹立し、ポマリドミド処理による増殖抑制効果が抑制されるかを検証した。これらの解析により、セレブロンがポマリドミド存在下において融合タンパク質(X-APL1)を分解することで、抗がん作用を示すことの証明が可能と考えられる。

4. 研究成果

(1) セレブロンの新しいネオ基質(X)の生化学的解析

質量分析により、同定したポマリドミド依存的なセレブロンの候補基質(X)について結合実験を行った。免疫沈降法により、タグ融合あるいは内在性の候補基質(X)は共にポマリドミド依存的にセレブロンと結合することを確認した。また、ヒト神経幹細胞 It-NES、ヒト急性骨髄性白血病細胞 KG1 など様々な細胞株において、ポマリドミド依存的に基質(X)のタンパク質量が減少することをウェスタンブロットおよび免疫染色により確認した(図1.a, b)。このとき、

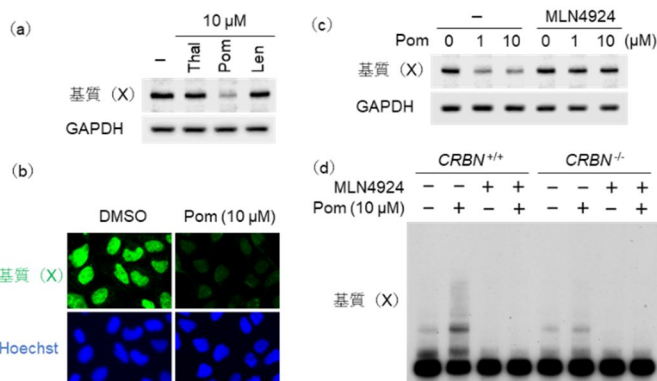


図1. セレブロンの新規ネオ基質(X)の生化学的解析

mRNA レベルでは基質 (X) の発現量は減少しないことをリアルタイム PCR により確認した。さらに、ユビキチンプロテアソーム阻害剤 MLN4924 を処理すると、基質 (X) のタンパク質減少はキャンセルされた (図 1.c)。続いて、CRISPR / Cas9 によるゲノム編集により、It-NES 細胞にてセレブロン KO (*CRBN*^{-/-}) 細胞株を樹立した。このセレブロン KO 細胞株では、ポマリドミド存在下においても、基質 (X) のタンパク質量の減少が抑制された。また、ユビキチンアッセイを行ったところ、ポマリドミド依存的に基質 (X) がユビキチン化されることも分かった。一方、セレブロン KO 細胞株では、ポマリドミド依存的な基質 (X) のユビキチン化が抑えられた (図 1.d)。以上の解析結果から、候補基質 (X) はセレブロン-ポマリドミド依存的にユビキチンプロテアソームを介して分解されることから、基質 (X) がセレブロンの新規ネオ基質であることが判明した。

(2) セレブロンの融合基質 (X-APL1) の生化学的解析

急性前骨髄球性白血病の病因となる融合基質 (X-APL1) がセレブロン-ポマリドミドに依存した基質であるかを検証した。まず、免疫沈降法により、タグ付きの融合基質 (X-APL1) がポマリドミド依存的にセレブロンと結合することを確認した。続いて、293T 細胞にて、X-APL1 を発現させ、ポマリドミドを処理し X-APL1 の分解をウェスタンブロットで解析した。その結果、ポマリドミド依存的に X-APL1 が分解されることが分かった。また、293T 細胞にてセレブロンを KO したところ、セレブロン-ポマリドミドによる X-APL1 の分解が抑制された。この結果から、融合基質 (X-APL1) も基質 (X) と同様に、セレブロンのネオ基質であることが証明された。

(3) セレブロンと結合する基質 (X) および融合基質 (X-APL1) のアミノ酸結合部位の同定

新規に同定した基質 (X) と融合基質 (X-APL1) は、セレブロンの既知のネオ基質に共通するジンクフィンガードメイン (ZF) と、そのドメインにある特定のグリシンを有している。そこで、X と X-APL1 にある ZF のグリシンをアラニンに置換した変異体を各々作製した。免疫沈降法により、ポマリドミド存在下におけるセレブロンと変異体との結合を検証した。その結果、基質 (X) と融合基質 (X-APL1) の特定のグリシンが、セレブロン-ポマリドミドによる結合に必須であることが判明した。

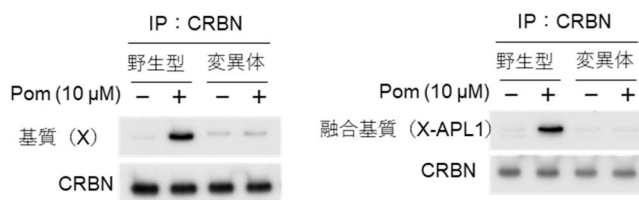


図 2 . ポマリドミドによるセレブロンとネオ基質 (X)・融合基質 (X-APL1) の各変異体の結合解析

(4) 急性前骨髄球性白血病のモデル細胞を用いたポマリドミドの増殖抑制効果の検証

条件付きで X-APL1 が発現する急性前骨髄球性白血病のモデル細胞株を入手し、臨床試験で用いられる濃度 (0.2 μM) のポマリドミドを処理した。その結果、ウェスタンブロットにより融合基質 (X-APL1) のタンパク質分解が生じることを確認した。続いて、この X-APL1 モデル細胞株において、ポマリドミド依存的な増殖抑制効果があるかを生細胞数測定により検証した。その結果、ポマリドミド濃度依存的に増殖の低下がみられた。また、セレブロン-ポマリドミドが X-APL1 の結合部位を介し、増殖抑制効果を示すかを検討した。まず、(3) で同定した特定のグリシンをアラニンに置換した X-APL1 変異体をもつレンチウイルスベクターを構築した。そして、X-APL1 の野生型と変異体を発現する細胞株を薬剤耐性マーカーによりセレクションし、発現安定株を樹立した。X-APL1 野生型の細胞株ではポマリドミドによる増殖抑制効果を示すが、グリシン変異体ではポマリドミドによる増殖抑制効果が抑えられた。これらの結果から、ポマリドミド存在下において、セレブロンが X-APL1 の特定のグリシンと結合し、分解を誘導することで抗腫瘍効果を示すことを証明した。本研究において、既存薬ポマリドミド存在下におけるセレブロンの新規ネオ基質 (X) と急性前骨髄球性白血病に関与する融合基質 (X-APL1) の分解機構を明らかにした。現在、本研究成果を筆頭著者として国際雑誌に投稿し、リバイズ中である (Shimizu et al, Communications Biology, 2021. 1st revision)。

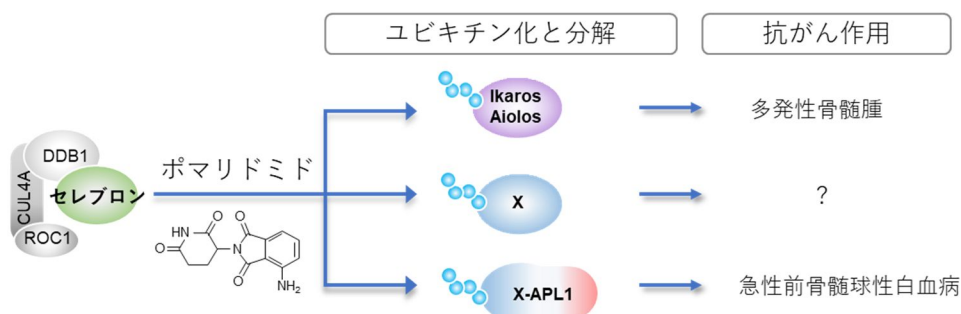


図 3 . ポマリドミドによる急性前骨髄球性白血病 (APL) への治療効果モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto Junichi, Suwa Tetsufumi, Murase Yuki, Tateno Shumpei, Mizutome Hirotaka, Asatsuma-Okumura Tomoko, Shimizu Nobuyuki, Kishi Tsutomu, Momose Shuji, Kizaki Masahiro, Ito Takumi, Yamaguchi Yuki, Handa Hiroshi	4. 巻 16
2. 論文標題 ARID2 is a pomalidomide-dependent CRL4CRBN substrate in multiple myeloma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1208 ~ 1217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-020-0645-3	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清水 誠之、伊藤 拓水、半田 宏	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 64
3. 書名 プロテアソームと疾病研究の動向 (セレブロンモジュレーターによるタンパク質分解創薬)	

〔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
---------	---------