

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710267

研究課題名(和文) サリドマイドによるセレブロン機能阻害機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of thalidomide induced CRBN-E3-ubiquitin-ligase inhibition mechanism

研究代表者

伊藤 拓水 (Ito, Takumi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：30533179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で研究代表者は、催奇性を有する抗がん剤サリドマイドがいかなるメカニズムで標的タンパク質セレブロンの機能を阻害するのかを検証した。セレブロンはユビキチンリガーゼとして機能する。研究結果として、サリドマイドはセレブロンの酵素活性を下げるというよりも、認識する基質を変化させることが示唆された。薬剤結合後はサリドマイドがもはや元の基質を認識できなくなることが、結果として機能阻害として検出されていたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Thalidomide is known for its teratogenicity, however it is also recognised as a clinically effective drug for the treatment of myeloma. Although the molecular targets of thalidomide were a long-standing question, we recently identified protein cereblon (CRBN) as a primary target of thalidomide induced teratogenicity. Our data suggest that thalidomide inhibits the E3 ubiquitin ligase function of CRBN but the detail mechanism is still largely unknown. In this study, I have analysed the inhibitory mechanism of the CRBN function by thalidomide using biochemical approaches. My data suggest that thalidomide binding to CRBN alters CRBN-E3-ubiquitin-ligase substrate specificity. Thus, thalidomide-bound CRBN may no longer recognise original substrates resulting in the inhibition of its E3-ubiquitin-ligase function.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：サリドマイド セレブロン ユビキチン 催奇性 多発性骨髄腫 IMiDs

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らのこれまでの研究によりサリドマイド催奇性の原因因子はセレブロン (cereblon, CRBN) であることが判明し、またサリドマイドがセレブロンの機能を阻害することにより四肢奇形を誘導することが示唆されたが (Ito et al. Science 2010)、いかなる機構でサリドマイドがセレブロンの機能を阻害しているのか不明であった。研究代表者はセレブロンに結合する因子群を探索し、サリドマイド処理により解離するタンパク質複合体 (CRBN interacting, CI) の単離に成功していた。CI を細胞内で RNA 干渉法により除去するとセレブロンが不安定化することも明らかにしていた。

2. 研究の目的

背景で明らかにした CI と CRBN の機能的相互作用に注目しながらサリドマイドによるセレブロン機能阻害機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

背景で述べたセレブロンと CI の機能的相互作用を検証するために、生化学的手法をもちいて解析した。その際に、サリドマイドより強くセレブロンに結合するサリドマイド誘導体レナリドマイドおよびポマリドマイド (IMiDs と総称) も実験に用い、サリドマイドと比較した。

4. 研究成果

(1) 平成 23 年度

サリドマイド催奇性における主要な標的因子がセレブロン (cereblon, CRBN) であることは以前の代表者らの研究により明らかになったが (Ito et al. Science 2010)、サリドマイドが CRBN と結合した後、いかなる変化を分子レベルにおいてもたらすのかについては不明であった。新たな安全で優れたサリドマイド誘導体を開発する上で、サリドマイドによる CRBN 機能阻害機構を明らかにすることは重要である。我々は以前にサリドマイド処理により CRBN から CI (CRBN-interacting) 複合体が解離することを明らかにしていた (Ito et al. Unpublished data)。本年度では、交付申請書に記載した計画に基づき、CRBN と CI の結合様式を解析した。187-260 (全 442 アミノ酸) の領域を欠損させた CRBN は、CI 複合体との結合能が著しく低下していたが、一方で別のサブユニットである DDB1, Cu14 (Cu14A, Cu14B) との結合能も低下していた。さらに解析したところ、CRBN と CI が結合するためには、Cu14 が足場として働く必要があることが示唆された。平行して、本研究の途中で CRBN がサリドマイド副作用だけでなく、サリドマイドおよび誘導体ポマリドマイドの主作用においても重要であるという報告が出

されたことから (Zhu et al. Blood 2011)、サリドマイドだけでなくより作用が強力なポマリドマイドにおいても CI 複合体が CRBN から解離するのかどうかを検証した。結果として、ポマリドマイドはサリドマイドより 10 倍程度、セレブロンへの結合能および CI 複合体の解離を促す活性が強いことが判明した (Lopez-Girona Leukemia 2012. 文献(3))。

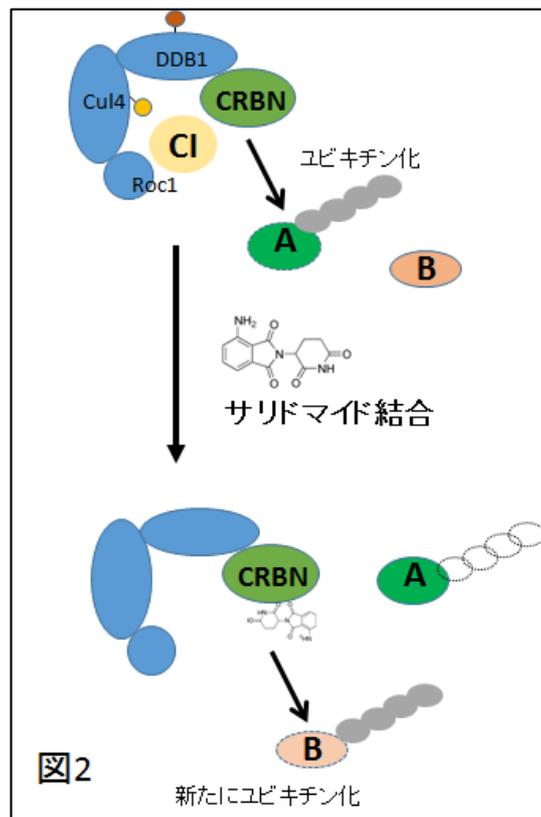
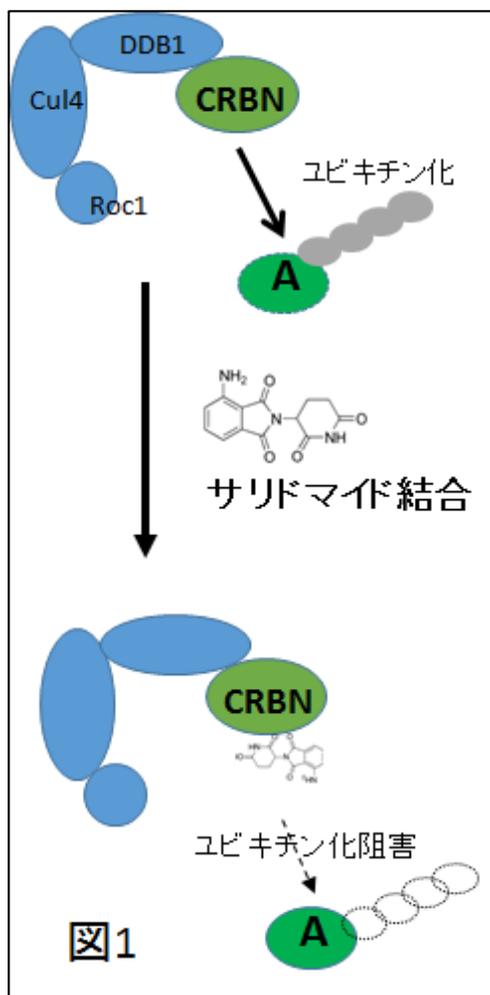
(2) 平成 24 年度

前年度において CRBN がサリドマイドだけでなく、その誘導体であるポマリドマイドやレナリドマイドにおいても主要な標的であることが判明し、CRBN からの CI の解離はそれら誘導体も促すことも判明したことから、CRBN の阻害機構解明において、各種サリドマイド誘導体も使用して行うことにしていた。本年度は、サリドマイドおよび誘導体により CI が解離する際の CRBN タンパク質複合体についてより詳細な解析を行った。昨年度において Cu14 が CRBN と CI の結合に必要とされることや、187-260 のアミノ酸領域 (CRBN 全長は 442 アミノ酸) を欠損させた CRBN 変異体においては CI が結合しないことを明らかにしていたので、今年度は点変異体を作製し、CI との結合量が変化するものを探索した。結果として、サリドマイド結合領域にあるアミノ酸 W386 に変異をいれた CRBN においては CI の結合量が增大していた。加えて CI が解離する際に、CRBN の主要な結合因子である DDB1 に未知の修飾があり、その修飾が薬剤量依存的に減少することが判明した。さらにこの修飾はリン酸化やアセチル化ではなく、タンパク質であることが判明した。この修飾に対する抑制効果は、CRBN への結合力の強さと相関があることも判明した。そこで、この修飾部位を欠損した DDB1 変異体が含まれる CRBN 複合体の機能を検証するために、DDB1 点変異体をいくつか作成した。

(3) 平成 25 年度

前年度に引き続き、DDB1 における未知の修飾部位の決定を行うため点変異体を引き続き作成して解析した。結果として、修飾が大幅に低下する変異体は得られたが、完全に消失するものは得られなかった。よって修飾箇所が 1 アミノ酸にとどまらない可能性が示唆された。また前年度からサリドマイド誘導体である lenalidomide (len) や pomalidomide (pom) も用いて解析を行っている。前年度の解析により CI 複合体を len や pom も解離させることが明らかになっていたため、CI をノックダウンしたのち、len, pom 処理を行い、多発性骨髄腫株の増殖抑制がコントロール細胞に薬剤処理した場合と比べて変化するかどうかを検証した。結果として、CI をノックダウンすると増殖抑制活性が低下するこ

とが判明した。また一方で、CRBN が Ien, pom が結合した場合は転写因子である Aiolos, Ikaros を認識し、ユビキチン化することが可能となることを明らかにした (Gandhi et al. BJH 2014, 文献(6))。ただし Aiolos や Ikaros が四肢形成など発生には関係するという報告はなく、ノックアウトマウスの形質も異なることから Aiolos, Ikaros はサリドマイド・IMiDs 催奇性の原因を担う因子ではないことが示唆された。これまでの結果を総合すると、サリドマイドや IMiDs は CRBN ユビキチンリガーゼの機能を単純に阻害するのではなく、基質特異性を変化させる役割をもつ可能性が考えられる。すなわちリガンド結合により以前の基質は分解されなくなるので結果として、それが阻害しているように見えるのである。その過程で CI の解離が生じることが示唆されており、CI は結合基質が変換する際に具体的にどう関わるのかを明らかにすることが今後の課題となる。



(図の説明)
 図1. 本研究の前に考えられていたモデル。サリドマイドは CRBN の基質に対するユビキチン化活性を阻害する。
 図2. 薬剤費存在下において CRBN は従来の基質 A をユビキチン化する。しかしサリドマイドやその誘導体 (IMiDs, レナリドマイドやポマリドマイドなど) が結合すると基質認識が変わり、新たな基質 B をユビキチン化するようになる。結果として基質 A のユビキチン化は抑えられるようになり、それが阻害作用として検出されていた。その際に、CI の解離が同時に生じている。

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 11 件)
 (英文、査読有)
- (1) Gandhi, A. K., Kang, J., Havens, C. G., Conklin, T., Ning, Y., Wu, L., Ito, T., Ando, H., Waldman, M. F., Thankurta, A., Klippel, A., Handa, H., Daniel, T. O., Schafer, P. H. and Chopra, R. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase

- complex CRL4^{CRBN}. Br. J. Haematol., 査読有, 164, 2014, 811-821. DOI: 10.1111/bjh.12708.
- (2) Hotta, K., Nashimoto, A., Yasumura, E., Suzuki, M., Azuma, M., Iizumi, Y., Shima, D., Nabeshima, R., Hiramoto, M., Okada, A., Sakata-Sogawa, K., Tokunaga, M., Ito, T., Ando, H., Sakamoto, S., Kabe, Y., Aizawa, S., Imai, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, H. and Handa, H. Vesnarinone suppresses TNF mRNA expression by inhibiting valosin-containing protein. Mol. Pharmacol., 査読有, 83, 2013, 930-938. DOI: 10.1124/mol.112.081935.
- (3) Ito, Y.*, Ito, T.* (共同筆頭著者), Karasawa, S., Enomoto, T., Nashimoto, A., Hase, Y., Sakamoto, S., Mimori, T., Matsumoto, Y., Yamaguchi, Y. and Handa, H. Identification of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) as a novel target of Bisphenol A. Plos ONE, 査読有, 7.2012, e50481. DOI: 10.1371/journal.pone.0050481.
- (4) Ito, T. and Handa, H. Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity. Congenital Anomalies, 査読有, 52, 2012,1-7. DOI: 10.1111/j.1741-4520.2011.00351.x.
- (5) Sakamoto, S., Hatakeyama, M., Ito, T. and Handa, H. Tools and methodologies capable of isolating and identifying a target molecule for a bioactive compound. Bioorg. Med. Chem., 査読有, 20, 2012, 1990-2001. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.12.022.
- (6) Lopez-Girona, A., Mendy, D., Ito, T., Miller, K., Gandhi, A. K., Kang, J., Karasawa, S., Carmel, G., Jackson, P., Abbasian, M., Mahmoudi, A., Cathers, B., Rychak, E., Gaidarova, S., Chen, R., Schafer, P. H., Handa, H., Daniel, T. O., Evans, J. F. and Chopra, R. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. Leukemia, 査読有, 26, 2012, 2326-2335. DOI: 10.1038/leu.2012.119.

(和文、査読無)

- (7) 伊藤拓水、安藤秀樹、半田宏「トピックス：サリドマイドの悲劇-その後の研究」キラル化学 -その起源から最新のキラル材料研究まで-CSJ カレントレビュー第13号 (2013) p180-182
- (8) 安藤秀樹、伊藤拓水、半田宏「セレブロン ~ IMiDs の標的因子 ~」血液フロン

ティア Vol.23 No.9 医薬ジャーナル社 (2013) p.1288-1292

- (9) 伊藤拓水、半田宏「サリドマイド・IMiDs の作用とユビキチンリガーゼ」医学のあゆみ Vol. 243 No.6 医歯薬出版株式会社 (2012) p.503-507
- (10) 伊藤拓水、安藤秀樹、半田宏「IMiDs の標的分子探索研究の進歩」血液内科 Vol.64 No.4 科学評論社 (2012) p.440-445
- (11) 伊藤拓水、安藤秀樹、半田宏「サリドマイドの催奇性メカニズム」化学と生物, Vol.49, No. 12. (2011) p.819-824.

〔学会発表〕(計2件)

- (1) 伊藤拓水、半田宏、「サリドマイド標的因子セレブロン:その発見から最新の知見まで」第23回生殖・発生毒性学東京セミナー(招待講演)2012年10月05日、独立行政法人 国立オリンピック記念青少年総合センター
- (2) 伊藤拓水、安藤秀樹、山口雄輝、半田宏「サリドマイドによる催奇形性の分子機構」第29回日本骨代謝学会学術集会(招待講演)2011年7月30日、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 拓水 (Ito, Takumi)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30533179