

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750374

研究課題名(和文)免疫調節薬IMiDsにおける抗がん活性の分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of the anti-cancer activity of IMiDs

研究代表者

伊藤 拓水 (Ito, Takumi)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30533179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では免疫調節薬IMiDsの作用機構の解析を行った。IMiDsの中でもCC-885は多くの細胞に対して強力な細胞増殖阻害活性を有し特に急性白血病細胞に感受性がある。セレブロンはユビキチンリガーゼとして機能することから、研究代表者はCC-885依存的なセレブロンの基質探索を行った。結果として翻訳終結因子GSPT1を単離した。そして本研究で解析した結果、CC-885の急性白血病への効果はGSPT1の分解により引き起こされる事を証明し、またセレブロンのCC-885を介したGSPT1認識の構造基盤も明らかにした。本成果はGSPT1を標的とする新たな急性白血病薬の開発を実現するものである。

研究成果の概要(英文)：In this project, I investigated new substrates of the CRBN E3 ubiquitin ligase in the presence of immunomodulatory drugs (IMiDs). A new compound, CC-885 was isolated by phenotypic screenings using various cell lines in Celgene. Among them acute myeloid leukemia (AML) cells were very sensitive to CC-885. I isolated a translation termination factor GSPT1, as a new substrate of the CRBN ubiquitin ligase. This study revealed that CC-885 induced anti-proliferative effect on AML cells through GSPT1 degradation. Furthermore, collaborative studies with Celgene revealed CRBN-CC-885-GSPT1 X-ray structure. CC-885 was shown to provide the interaction hotspot in CRBN for binding to GSPT1. Furthermore, we found a specific glycine of the substrate is critical for binding to CRBN in the presence of a ligand such as CC-885. This study presents a new therapeutic target for the treatment of AML and the structural basis of the CRBN-ligand-substrate complex.

研究分野：生化学、分子生物学、ケミカルバイオロジー

キーワード：セレブロン ユビキチン GSPT1 IMiDs CC-885 レナリドミド ポマリドミド サリドマイド

1. 研究開始当初の背景

1950年代に鎮静剤として開発されたサリドマイドは、妊娠女性が服用すると新生児に四肢奇形などの異常が生じることで世界的な薬害を引き起こしたことで知られる。しかし現在では、血液がんの一種である多発性骨髄腫に優れた改善効果を有することなどが判明し、厳格な統制の下、再び処方認可されている。また、サリドマイドより強力な作用を有する誘導体も米国セルジーン社により開発されており、免疫調節薬 (Immunomodulatory drugs, IMiDs) と総称されている。

サリドマイドや IMiDs の標的は長年にわたり不明であったが、研究代表者らにより、主要な標的因子セレブロン (cereblon, CRBN) が 2010 年に発見された。

セレブロンはタンパク質分解を誘導するユビキチンリガーゼと呼ばれる酵素として働くことが判明している。しかしながら、実際に分解する対象のタンパク質 (基質) は不明であった。

そこで研究代表者は様々な IMiDs 存在下におけるセレブロン結合因子の探索を行った。結果として IMiD A1 (CC-885, 図 1) 存在下においてセレブロンに結合する新しいタンパク質 X1-3 のシグナルを発見していた。また他の IMiDs においても X4, 5 を発見していた。これらの因子 X1-5 がセレブロンの基質候補として考えられた。

2. 研究の目的

IMiDs の抗がん作用の分子機構を明らかにするために、セレブロンの基質を明らかにし、CRBN の基質を網羅的に単離・同定し、IMiDs CRBN 基質 下流因子 がん細胞抑制の分子経路の詳細を明らかにすることを主な目的とした。

3. 研究の方法

まず抗体を用いた免疫沈降実験により、改めて IMiDs 存在下におけるセレブロン結合因子を探索した。次に、候補因子について IMiDs を生細胞に処理した際に、分解が生じるのかを確認した。その後、invitro におけるユビキチン化や、非分解型変異体の作製および、非分解型変異体発現細胞における IMiDs の作用を検証した。セレブロン、IMiDs、基質の複合体構造は未だ不明であることから、もし結晶化することができたならば、共同研究により X 線結晶解析など構造解析も行うことを計画した。この解析により、セレブロンが薬剤存在下でどのように基質を認識するのかの詳細を明らかにすることが可能となる。

4. 研究成果

(1) CC-885 存在化におけるセレブロン基質 X1-3 の解析
 様々ながん由来の細胞株に IMiD である CC-885 を処理したところ、子宮頸がん由来

HeLa 細胞や胎児腎臓由来 293T など 10 nM-100nM オーダーで増殖抑制がみられた。特に急性骨髄性白血球株においては 1 nM 以下の濃度、すなわちサブナノモルオーダーで効果があった (図 2)。

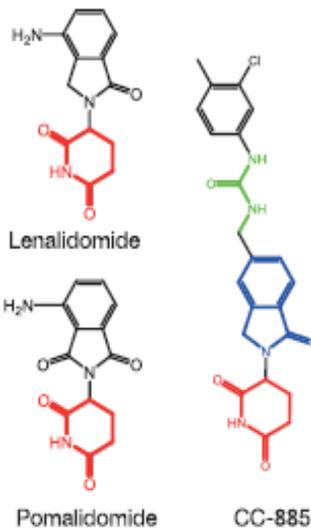


図 1. IMiDs の構造

しかしながら CRISPR/Cas9 でセレブロン遺伝子をノックアウトすると、その効果は完全に消失した。つまり、CC-885 の効果はセレブロンに依存していることが確認された。

そこで次にセレブロンユビキチンリガーゼの基質を単離するため、ここで生化学的な実験が容易な 293T 細胞において FLAG-HA-エトープタグをつけたセレブロンを安定的に発現させた株を樹立し、その細胞抽出液に CC-885 を混合して FLAG 抗体による免疫沈降を実施した。

結果として 80 kDa 付近にシグナル X1 が確認され、質量分析により同定したところ GSPT1

	KG-1	KG-1a
Lenalidomide (μM)	>10.0	>10.0
Pomalidomide (μM)	>10.0	>10.0
CC-885 (μM)	0.0007	0.0008

図 2. AML への効果

(G1 to S phase transition 1) であることが判明した (図 3)。GSPT1 は別名 eRF3a (eukaryotic releasing factor 3a) とも言われ、タンパク質翻訳の最終段階である終止コドン認識に関わる複合体

のサブユニットの一つとして知られている。X2, 3 は GSPT1 そのものもしくは、その関連因子であった。また酵母から保存されていることが知られており、GSPT1 を欠損すると増殖抑制が生じることも既に報告されていた。

CC-885 を AML 細胞株や 293T 細胞に処理したのち、GSPT1 のタンパク質量をウェスタンブロッティングで解析したところ、GSPT1 の減少がみられた。そしてサリドマイドやレナリドミド、ポマリドミド (図 1) など既存の IMiDs を処理した際には、GSPT1 分解が生じていないことも判明した。さらにセレブロンをノックアウトした細胞においては CC-885 による GSPT1 分解は見られなかった。次に GSPT1 の分解が、ユビキチン依存的な分解であることを MG132 などの阻害剤を用いたり、

また試験管内で CC-885 依存的なユビキチン化反応を実施したりすることにより確認した。

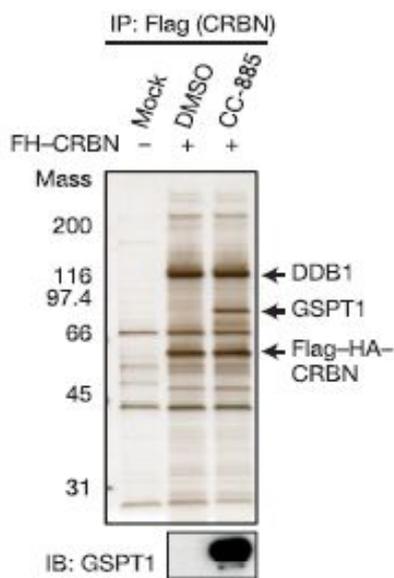


図 3. 免疫沈降実験による CC-885 存在下における、セレブロン結合因子 GSPT1 の単離

GSPT1 が CC-885 依存的なセレブロンの基質であることが示唆されたので、次に GSPT1 におけるセレブロン結合領域を、

GSPT1 の欠損変異体を用いること

により検証した。GSPT1 は C 末に domain 2/3 と呼ばれる領域を有するが、セレブロンは CC-885 結合下では、その domain 2/3 に結合していることが判明した。また酵母の GSPT1 ホモログである SUP35 は CC-885 による分解を受けないことが分かったので、ヒト GSPT1 と SUP35 のアミノ酸配列を比較し、最終的に domain 2/3 内にあるヒト GSPT1 の G575 を酵母の N に置換するだけで非分解型の変異体になることを明らかにした。

次に、AML 細胞である MOLM13 および OCI-AML2 に GSPT1 G575N を発現させた、CC-885 を処理した。結果として CC-885 による増殖阻害活性が野生型と比べて抑制されており、CC-885 の効果は GSPT1 分解を伴うものであることが証明された。

上記で明らかにした GSPT1 の domain 2/3 は既に結晶化および X 線構造解析が報告されていた。そこで米国セルジーン社と共同でセレブロン-CC-885-GSPT1 複合体の X 線構造解析も行うことにした。セレブロンは DDB1, Cul4, Roc1 とユビキチンリガーゼ複合体を形成するが、常に DDB1 と存在しており、DDB1 存在下で安定する。そこでセレブロン/DDB1-CC-885-GSPT1 複合体を結晶化させ、解像度 3.6 Å で決定した(図 4)。結果として、CC-885 はセレブロンに結合した後、セレブロンと GSPT1 の間の相互作用の場を提供する役割を果たしている事が判明した。セレブロンはリガンド CC-885 と基質である GSPT1 両方

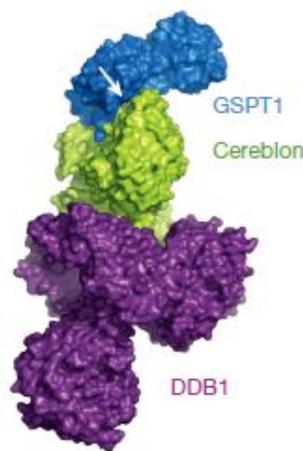


図 4. セレブロン/DDB1-CC-885-GSPT1 の結晶構造。矢印は CC-885 を表す。

に結合していた。セレブロンは薬剤結合領域のある C 末だけでなく、N 末領域も使って GSPT1 と結合することが判明した。GSPT1 は特定の折り返し構造が存在しており、そこにアミノ酸のグリシン 575 が存在していた。このグリシンは前述

した非分解型 GSPT1 変異体 G575N の位置

と同一であった。ラムチャンドラプロットによると、GSPT1 の 575 は最小のアミノ酸であるグリシンのみが許容されていた。グリシン以外のいかなるアミノ酸(例えばアラニンなど)に置き換えても、セレブロン、CC-885 との相互作用が失われることが判明した。レナリドミドやボマリドミド存在下の既知の基質として Ikaros が存在するが、Ikaros においても特定のグリシンが存在していることが判明した。本研究では、特定の基質におけるセレブロン認識配列は見つからなかったが、少なくともグリシンは共通していることが示唆された。

本研究において CC-885 存在下におけるセレブロンによる GSPT1 分解の機構が明らかになり、またセレブロン、リガンド、基質の相互作用の構造基盤が明らかとなった(図 5)。

セレブロン・ユビキチンリガーゼ



図 5. CC-885 のセレブロンを介した急性骨髄性白血病への治療作用のモデル

(2) 他の IMiDs 存在下により単離された別のセレブロン結合因子 X4, X5。

X4, X5 は他の IMiDs 存在下で発見された。X4 は薬剤による分解を受けなかった。よって新しいタイプのセレブロン結合因子であることが示唆された。X5 については特定の IMiDs でのみセレブロンとの結合・分解を受けた。

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 10 件)

1. Ito T, Handa H. Cereblon and its downstream substrates as molecular targets of immunomodulatory drugs. *Int J Hematol*.104(3):293-9 (2016). 査読有 doi: 10.1007/s12185-016-2073-4.
2. Matyskiela ME*, Lu G*, Ito T* (共同筆頭著者), Pagarigan B, Lu CC, Miller K, Fang W, Wang NY, Nguyen D, Houston J, Carmel G, Tran T, Riley M, Nosaka L, Lander GC, Gaidarova S, Xu S, Ruchelman AL, Handa H, Carmichael J, Daniel TO, Cathers BE, Lopez-Girona A, Chamberlain PP. A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase. *Nature*. 22;535(7611):252-7 (2016). 査読有 doi:10.1038/nature18611
3. Ito T, Ando H, Handa H. Discovery of the target for immunomodulatory drugs (IMiDs). *臨床血液* 57(5):556-62 (2016). 査読無し doi: 10.11406/rinketsu.57.556
4. 伊藤拓水, 山本淳一, 半田宏. 免疫調節薬 (immunomodulatory drug: IMiDs) による抗骨髄腫効果の作用機序. *日本臨床* (2016) 74 巻 増刊号 5 152-157. 査読無し
5. 伊藤拓水, 半田宏 「サリドマイドの標的ユビキチンリガーゼ “セレブロン” とその機能」医学のあゆみ Vol.256, No.8 医歯薬出版株式会社(2016) 891-895 査読無し
6. Ito T, Handa H. Myeloid disease: Another action of a thalidomide derivative. *Nature*. 9;523(7559):167-8 (2015). 査読有 doi: 10.1038/nature14628
7. 伊藤拓水, 安藤秀樹, 半田宏 「サリドマイド標的セレブロンの同定と催奇形性 (Phocomelia)」日本臨床 Vol.73, No.1. 日本臨床社 (2015) p.143-148 査読無し
8. 坂本聡, 伊藤拓水, 半田宏 「半田ビーズを用いたサリドマイド標的の同定」生物活性分子の標的の同定の機能解明 CSJ カレントレビュー第19号 化学同人 (2015) p.86-93 査読無し
9. 伊藤拓水, 安藤秀樹, 半田宏 「IMiDs とセレブロン」基礎と臨床2015 メディカルレビュー社(2015) p26-34 査読無し
10. Chamberlain PP, Lopez-Girona A, Miller K, Carmel G, Pagarigan B, Chie-Leon B, Rychak E, Corral LG, Ren YJ, Wang M, Riley M, Delker SL, Ito T, Ando H, Mori T, Hirano Y, Handa H, Hakoshima T, Daniel TO, Cathers BE. Structure of the human Cereblon-DDB1-Ienalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. *Nat Struct Mol Biol*. 21(9):803-9 (2014). 査読有 doi: 10.1038/nsmb.2874

[学会発表](計 4 件)

1. 伊藤拓水, 半田宏 「急性骨髄性白血病に効果を示す新規のセレブロンモジュレーター」第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日
2. 伊藤拓水, 半田宏 「急性骨髄性白血病に有効な新規セレブロンモジュレーターの開発」第 89 回日本生化学会大会、仙台

国際センター、仙台、2016年9月25日-27日

()

3. 伊藤拓水、朝妻知子、山本淳一、安藤秀樹、佐藤智美、山口雄輝、半田宏「リガンド依存的ユビキチンリガーゼ CRBNの制御機構」、日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会、京都テルサ、京都、2016年6月15日-17日

研究者番号：

4. 伊藤拓水、安藤秀樹、山口雄輝、半田宏「Cereblon is a substrate receptor of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase whose activity is directly controlled by thalidomide and its analogs」、Cold Spring Harbor Asia、Protein Modification & Homeostasis conference、蘇州、中国、2014年6月18日（招待講演）

(4)研究協力者

()

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計1件)

名称：Methods of using an activator of cereblon for neural cell expansion and the treatment of central nervous system disorders.

発明者：Hiroshi Handa, Hideki Ando, Takumi Ito

権利者：同上

種類：特許

番号：W02015127351 A1

取得年月日：2015年8月27日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 拓水 (Takumi Ito)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30533179

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者