

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04213

研究課題名(和文) 免疫調節薬IMiDsにおける作用機構の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular basis of IMiDs' action

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では免疫調節薬(IMiDs)の作用機構の分子基盤を解明することを目的とし、ユビキチンリガーゼとして機能するIMiDsの標的因子CRBNの新たな基質候補であるS1および非基質であるX1の解析を行った。研究期間を通して、S1が実際にCRBNのネオ基質であることを生化学的な実験により明らかにし、またS1がびまん性大細胞型B細胞リンパ腫や血管新生といった多発性骨髄腫以外の現象にも関わっていることを新たに発見した。X1についても検証を行い、X1におけるCRBN結合領域を明らかにした。またさらにCRBNのネオ基質をいくつか明らかにし、その機能を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫調節薬(IMiDs)は現在、多発性骨髄腫などの優れた治療薬として世界的にも脚光を浴びているが、その分子基盤について不明な点が多かった。今回、研究代表者によりIMiDsの標的であるCRBNのさらに下流に位置するS1および他の基質の実態が明らかになった。S1はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫や血管新生などにも関わることが判明し、IMiDsのさらなる適応拡大に貢献できる成果をあげられたといえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to elucidate the mechanistic basis of the CRBN-based IMiDs signaling. I have analyzed a substrate candidate S1 and a non-substrate X1 of CRBN, a substrate receptor of CRL4 E3 ubiquitin ligase. I found S1 is an exact IMiD-dependent CRBN substrate and is responsible for anti-DLBCL (Diffused Large B-Cell Lymphoma) and anti-angiogenesis other than anti-myeloma effects of IMiDs. I also found the structural degron of S1. I determined the CRBN-binding domain in X1. I newly isolated and analyzed several new CRBN neosubstrates.

研究分野：ケミカルバイオロジー・分子生物学

キーワード：サリドマイド セレブロン ユビキチン PROTACs CRBN

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1950年代前半、IMiDsの原型と言われるサリドマイド(Thal)は深刻な催奇性を有することから世界的な薬害を引き起こしたことで知られるが、血液がんの一種である多発性骨髄腫に対し優れた治療効果があることが判明し再評価されるに至っている。米国セルジーン社(現・プリストルマイヤーズスクイブ)はThalから派生した誘導体群から強い免疫調節効果を有する化合物を見出しており免疫調節薬(IMiDs)と名付けている。その中でもレナリドミド(Len)およびポマリドミド(Pom)は、Thalより遙かに強力な作用を有し、世界中で注目されている。Lenは多発性骨髄腫の他、骨髄異形成症候群(5q-)への処方方が2010年に我が国で認可され、より次世代のPomにおいてはLen耐性の多発性骨髄腫患者への処方方が2013年に米国で認可されている。2010年に研究代表者らが、サリドマイド・IMiDsの標的因子Cereblon(CRBN)を発見し、その分子機構の理解はかなり進んだ。我々を含む複数の国際的産学研究グループによりCRBNはIMiDsに直接結合し、それらの有する主作用(抗がん作用、抗炎症作用)副作用(催奇性)両方における必須因子であることが明らかにされた。現在では、CRBNは薬剤が結合するとその種類に応じて新たな基質を認識するユニークなユビキチンリガーゼであると考えられており、世界中の研究者でコンセンサスが得られている。しかしながら、IMiDsの作用機構の分子基盤は不明な点が多く残されていた。研究代表者がIMiD依存的にCRBNに結合するタンパク質を単離するための特殊な免疫沈降を行い、基質を探索していたところ更に新しい基質S1が単離され、それに加えてCRBNには結合するが分解されることのない非基質X1を新しく発見した。

### 2. 研究の目的

新たに単離した基質S1や制御因子と思われる非基質(X1など)のIMiDsの薬効への関わりについて生化学・分子生物学的に厳密な解析を行うことにより、これらの因子群の機能を明らかにし、さらにプロテオミクスにより他の基質・非基質の探索もおこなう。トランスクリプトーム解析によりS1やX1などの下流因子も把握することを通して、IMiDs作用の分子基盤を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

IMiDs→CRBN→基質/非基質の分子機構の解析を実行した。(1)すでに明らかにしてきた新たな基質S1の生化学的解析(2)非基質X1の生化学的解析(3)プロテオミクスによる新たな基質・非基質の探索(4)S1、X1とIMiDsの薬効の関係性について主にトランスクリプトームによる解析(5)S1などを改変した細胞株を用いた検証を行った。方法として、最新の生化学およびプロテオミクス、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析や、CRISPR/Cas9などゲノム編集を利用した分子生物学的アプローチを採用する。また様々なIMiDs化合物や薬剤耐性骨髄腫株を使用した。

### 4. 研究成果

#### (1) 基質S1のCRBN結合領域の決定

基質S1はZinc fingerを有しており、近年の研究によりCRBN結合領域はQCXXCG(Xは任意のアミノ酸)といった特定の配列であることが判明しつつある。研究代表者はS1よりその配列を探したところCXXCGのところは同一の配列を二か所発見したことにより、それらのGlycineに変異をいれ、CRBNとの結合および薬剤による分解を解析したところ、片方のみ結合および分解が抑制されることが判明した(図1)。それに加えてS1が結合するのにCRBN V388が重要であることを明らかにした。V388をイソロイシンに置換するとS1との結合能が失われることを明らかにした(図2)。

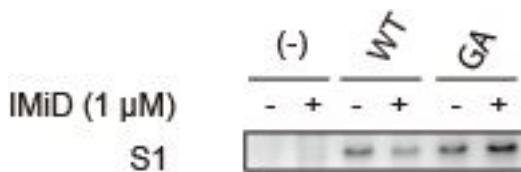


図1 Glycine 変異体

CXXCGの一つについてGlycineをアラニンに変換させたものを293T細胞に発現させ、IMiDsを処理したところ、分解がみられなくなることが判明した。



図2 CRBN の V388 の重要性

CRBN における V388 をマウスの I に変換し、CRBN を発現していない 293T に発現させ、IMiDs を処理したところ、WT と比べて分解がみられなかった。E377 は結合に重要でない事も分かった。N351 は以前の研究により CRBN が基質認識をする上で重要であることが確認されている。

### (2) 非基質 X1 の生化学的解析

非基質 X1 について生化学的な実験を行い、CRBN の結合する領域を決定した。また X1 は mouse の CRBN とも結合することを明らかにした (図3)。これまで Ikaros, Aiolos, GSPT1 など基質で知られているタンパク質で Mouse CRBN と結合することが確認できたものはなく、X1 のみ Mouse でも IMiD 依存的に結合することから大変興味深い因子であることが判明した。

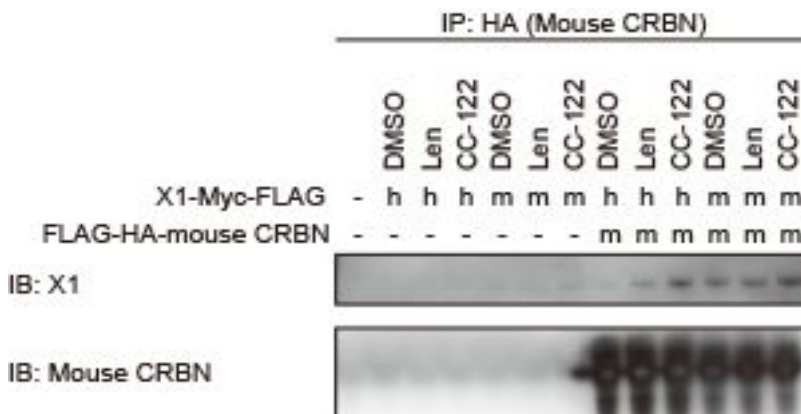


図3 X1 と CRBN の結合。CRBN を CRISPR/Cas9 で除去した 293T 細胞に X1 と mouse CRBN を共発現させ、共免疫沈降実験を行った。結果として Mouse CRBN は human X1, mouse X1 両方と IMiD 存在下で結合することが分かった。

### (3) S1-F1 の解析

CRBN 基質 S1 は F1 と呼ばれる因子と融合タンパク質をつくり、白血病などの発症に関わることが判明した。融合因子 S1-F1 についても IMiD で分解されるかどうかを検証した。結果として、S1-F1 も分解されることが判明し、S1-F1 の関わる白血病などにおいて IMiD の適応拡大を図れる期待が得られた。

### (4) S1 の生理的役割

CRBN 基質 S1 について、トランスクリプトーム解析を行った際に、NOTCH4 や HIF1 の減少が見られたところから、S1 は血管新生に関係する可能性が示唆された。ただし S1 はサリドマイドによる分解は受けないために、サリドマイドの持つ血管新生阻害作用とは異なる可能性が高い。次に S1 を GCB-DLBCL の細胞株においてレンチウイルスを介したノックダウンを行ったところ、増殖抑制が見られることが判明した。GCB-DLBCL は IMiD による増殖抑制がかかることから、S1 は DLBCL の治療標的にもなり得ることが示唆された。

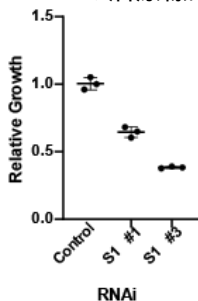


図4 DLBCL 株における S1 のノックダウン。DLBCL 株の増殖抑制がみられた。

### (5) 新たな CRBN 基質

プロテオミクス解析を行い、新たな CRBN 基質を発見した。

基質の一つはサリドマイド催奇形性に関わり、他のものは神経発生に関わることなどが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Akihiro Kimura, Masayuki Kitajima, Kyoko Nishida, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Tetsuji Naka, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Satoshi Sakamoto, Takumi Ito, Hiroshi Handa, Takashi Tanaka, Akihiko Yoshimura, Harumi Suzuki	4. 巻 215
2. 論文標題 NQO1 inhibits the TLR-dependent production of selective cytokines by promoting I B- degradation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 2197-2209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20172024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomoyuki Mori, Takumi Ito (co-1st author), Shujie Liu, Hideki Ando, Satoshi Sakamoto, Yuki Yamaguchi, Etsuko Tokunaga, Norio Shibata, Hiroshi Handa & Toshio Hakoshima	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19202-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ando, H., Sato, T., Ito, T., Yamamoto J., Sakamoto, S. Nitta, N. Asatsuma-Okumura, T., Shimizu, N., Mizushima, R., Aoki, I., Imai, T., Yamaguchi, Y., Berk, A., J., and Handa, H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Cereblon Control of Zebrafish Brain Size by Regulation of Neural Stem Cell Proliferation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 95-108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Asatsuma-Okumura, T., Ando, H., De Simone, M., Yamamoto, J., Sato, T., Shimizu, N., Asakawa, K., Yamaguchi, Y., Ito, T., Guerrini, L., Handa, H.	4. 巻 15
2. 論文標題 p63 is a cereblon substrate involved in thalidomide teratogenicity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1077-1084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-019-0366-7	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 該当する

1. 著者名 Tateno, S., Iida, M., Fujii, S., Suwa, T., Katayama, M., Tokuyama, H., Yamamoto, J., Ito, T., Sakamoto, S., Handa, H., Yamaguchi, Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome-wide screening reveals a role for subcellular localization of CRBN in the anti-myeloma activity of pomalidomide.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61027-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 伊藤拓水、半田宏
2. 発表標題 新規セレブロンモジュレーターの分子機構の解析
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matyskiela M, Lu G, Ito T, Pagarigan B, Lu CC, Miller K, Fang W, Wang NY, Nguyen D, Houston J, Carmel G, Tran T, Riley M, Nosaka L, Lander G, Gaidarova S, Xu S, Ruchelman A, Handa H, Carmichale J, Daniel TO, Cathers BE, Lopez-Girona A and Chamberlain P
2. 発表標題 Ligand-directed degradation of GSPT1 by a novel cereblon modulator drives potent antitumor effects
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤拓水、半田宏
2. 発表標題 セレブロンモジュレーターによるユビキチンリガーゼ制御工学
3. 学会等名 日本薬学会第138年会(招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
連携研究者	朝妻 知子  (Asatsuma Tomoko)  (70732303)	東京医科大学・医学部・助教   (32645)	プロテオミクス解析を実施
連携研究者	山本 淳一  (Yamamoto Junichi)  (40748472)	東京工業大学・生命理工学院・助教   (12608)	トランスクリプトーム解析を実施