

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21617

研究課題名(和文) IMiDsにおける新規基質同定による新規がん治療戦略の構築

研究課題名(英文) Establishment of novel therapeutic strategies against cancers via identification of neosubstrate of IMiDs

研究代表者

菊繁 吉謙 (Kikushige, Yoshikane)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：40619706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、ヒト正常造血幹細胞から分化誘導したヒト巨核球を用いた実験により、IMiDsが血小板減少を誘導する分子機構として、巨核球におけるproplatelet formation(PPF)誘導に必要なアロマトラーゼがIMiDsによる分解を受けることで成熟血小板産生が障害されること、IMiDs内服により、骨髄腫患者内でアロマトラーゼ量が減少することを見出した。したがって、IMiDsはアロマトラーゼを分解誘導することでアロマトラーゼ阻害剤と同様に閉経後乳癌において抗腫瘍効果を果たす可能性が考えられ、本研究においてIMiDsの新規器質探索とともにIMiDsの乳癌治療への応用を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行によりIMiDsによる血小板減少症の原因としてアロマトラーゼの分解が生じること、さらにIMiDsによる血栓症リスク上昇の原因として、巨核球、血小板において分子Xの蓄積が生じることが明らかになった。これらの結果からIMiDsによるメジャーな副作用の分子学的メカニズムを明らかとすることができた。さらにIMiDsによるアロマトラーゼ分解を閉経後乳癌の治療への応用の可能性を評価する研究を行い、今後応用のための基盤的研究としての重要な意義があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have identified aromatase as a neo substrate of cereblon responsible for thrombocytopenia induced by IMiDs; IMiDs promote the recruitment of aromatase to cereblon, resulting in the degradation of aromatase in a proteasome-dependent manner, and the degradation of aromatase lead to the inhibition of proplatelet formation (PPF), an essential step for platelet production in human. Since aromatase represents a critical therapeutic target for postmenopausal breast cancer, we sought to establish a novel therapeutic strategy against breast cancer using IMiDs as a degrader of aromatase. Furthermore, we also tried to identify another neo substrate of cereblon to explain the pleiotropic effect of IMiDs, and identified "molecule X" as a neo substrate of cereblon responsible for IMiDs-induced thrombosis.

研究分野：血液内科学

キーワード：IMiDs thrombosis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Immunomodulatory drugs (IMiDs) (サリドマイド、レナリドマイド等)は、多発性骨髄腫の治療を劇的に変えた薬物の一つである。IMiDs はセレブロン (CRBN) と結合し、新規基質をユビキチン化し分解する、あるいは本来の基質の分解を妨げ蓄積させる。このように IMiDs により CRBN との結合性が変化する基質は neo-substrate と定義され、IMiDs の薬効および副作用を理解する上で非常に重要である。

2. 研究の目的

IMiDs による骨髄腫治療において、臨床的に重要な副作用として血小板減少が挙げられる。血小板減少は治療中断の重要な原因である。我々は、IMiDs による血小板減少の原因解明に取り組み、Aromatase (AROM) がその原因となる neo-substrate である可能性を先行研究において、見出した。本研究は、IMiDs による AROM 分解メカニズム解明を進めると同時に IMiDs による AROM 分解が乳癌治療へ応用可能か検討し、新規乳癌治療法開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

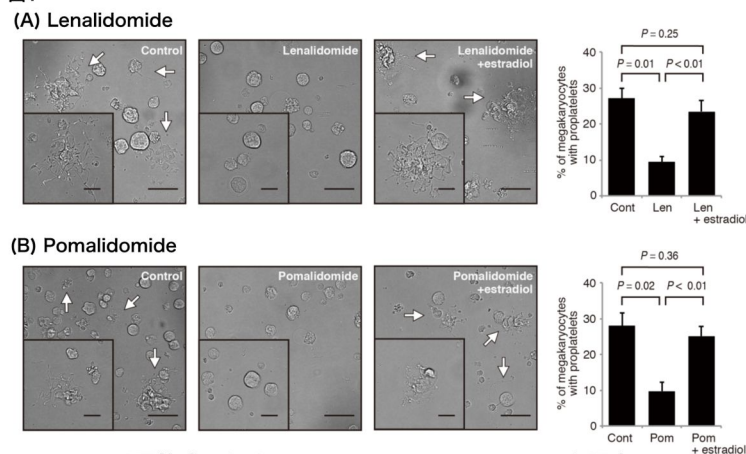
まず、先行研究で見出した IMiDs における neo-substrate としての AROM について、さらに詳細に解析を行う。さらに IMiDs の多彩な薬理作用を理解するために、AROM 以外の巨核球および血小板に特異的な neo-substrate の同定に取り組む。具体的には、質量分析装置を用いたタンパク質解析により、IMiDs により CRBN との結合性の変動するタンパク質を同定し、neo-substrate であるかどうかを CRBN との結合性を *in vitro* で評価し、解析することで新規 neo-substrate を同定する。さらに、先行研究において neo-substrate の可能性を見出した AROM に関しては IMiDs による AROM 分解を介した乳癌治療モデルの構築に取り組む。

4. 研究成果

(1) IMiDs は巨核球における estradiol 合成阻害により proplatelet formation (PPF) を阻害する

申請者は IMiDs の CD34+ ヒト造血幹前駆細胞 (HSPCs) への影響を検討した。IMiDs は前駆細胞レベルでは巨核球系統への分化を誘導することを見出した。IMiDs 投与中の血小板減少を生じた患者骨髄中においても巨核球数は減少していなかった。臍帯血由来 CD34+HSPCs を *in vitro* で巨核球へ誘導し、血小板への分化過程を検討したところ、血小板産生の最終段階である proplatelet formation (PPF) という、巨核球が樹状形態に変化する段階が IMiDs により強力に抑制されることを見出した。網羅的遺伝子発現解析を行なったところ、

図1



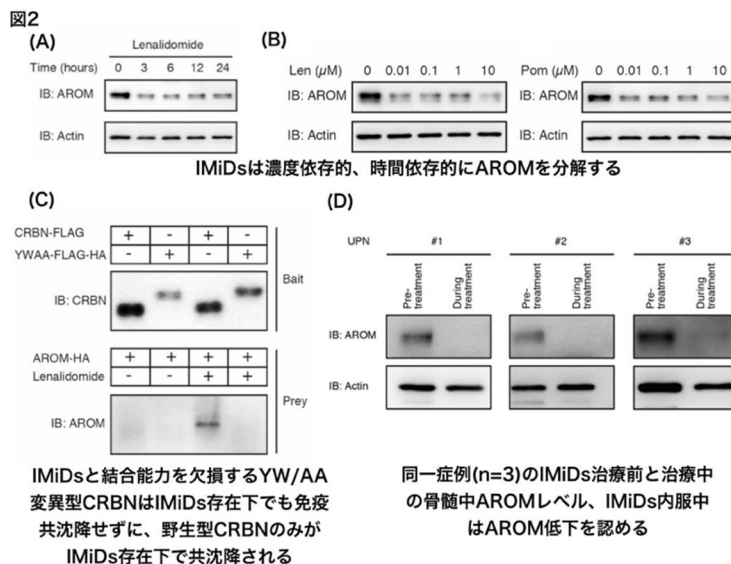
IMiDs は巨核球における proplatelet formation (PPF) を阻害し、その阻害作用は estradiol 添加により完全にキャンセルされる

巨核球における estradiol response 遺伝子群が強力に抑制されていた。巨核球においては、estradiol を合成し自身に作用させる autocrine-loop の存在が報告されていたことから、estradiol を添加により IMiDs による PPF 阻害は完全にキャンセルされた (図1)。したがって、これらのデータからは、ヒト巨核球において IMiDs により何らかの機序で内因性の estradiol 合成が障害されている可能性が示唆され、PPF 阻害により血小板産生の最終段階が障害されていると考えられた。

(2) AROM は IMiDs の neo-substrate である

次に IMiDs による estradiol 合成経路関連タンパク質の変化を測定したところ、estradiol 合成の最終段階に必要な aromatase (AROM) が IMiDs により、時間依存的、濃度依存的に低下した

(図 2A,B)。IMiDs は AROM の転写レベルに影響を与えず、プロテアソーム阻害剤により IMiDs の AROM 減少がキャンセルされることから、AROM は IMiDs によりプロテアソーム依存的に分解される neo-substrate であると考えられた。免疫共沈降実験においても、IMiDs との結合能を欠損させた変異型 YW/AA-CRBN では IMiDs 存在下でも AROM と結合せず、野生型 CRBN とのみ IMiDs 存在下で共沈降下 (図 2C) 実際 IMiDs 治療中の骨髄腫症例の骨髄において治療前後で AROM は低下することを確認した (図 2D)。以上から AROM は IMiDs の neo-substrate であり、AROM 低下による PPF 阻害が、IMiDs 治療に伴う血小板減少の原因と考えられた。



(3)新規 neo-substrate 解析

上記検討結果から AROM が IMiDs の neo-substrate であることが考えられた。本研究では AROM 以外の血小板関連 neo-substrate の探索を行なった。臍帯血由来 CD34 + 細胞を液体培地で培養し、選択的に巨核球へ誘導する実験系を用いて、IMiDs 存在下でタンパク量が変動するヒト巨核球由来のタンパクを質量分析装置により解析した。その結果、新規に分子 X がヒト巨核球において IMiDs の neo-substrate であることを見出した。分子 X は IMiDs 存在下でのみ、プロテアソームでの分解が抑制され、IMiDs により巨核球内で蓄積することを見出した。すなわち、分子 X は CRBN の内在性基質であり、IMiDs 存在下で CRBN との結合性が変化することでプロテアソームによる分解が減少する分子と考えられた。分子 X は血栓形成において重要な役割を担う分子であることが知られており、IMiDs の重要な副作用の一つである血栓症に関して、その責任分子である可能性を現在検証している。

(4) IMiDs による乳癌治療モデルの樹立

閉経後乳癌の薬物治療の第一選択は AROM inhibitor (AI) であるが、AI による AROM 活性抑制と IMiDs による AROM の直接的分解は作用機序が全く異なり相乗効果が期待される。したがって本研究計画では、AROM が IMiDs の neo-substrate であり、IMiDs 服用中の骨髄腫症例において上述のように AROM の分解が生じていることを見出したことから、IMiDs による乳癌治療モデルの構築に取り組んだ。一般的に乳癌における主要なエストロゲン産生細胞は、腫瘍自身ではなく、周囲環境に存在する脂肪細胞等であると考えられている。そこで我々はまず、乳癌細胞株とエストロゲン産生細胞を同時に免疫不全マウスに移植する系を確立した。現在、このエストロゲン産生腫瘍モデルを用いたマウスモデル実験を継続し、IMiDs による抗乳癌作用の in vivo での確認に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tochigi Taro, Miyamoto Toshihiro, Hatakeyama Kiwamu, Sakoda Teppei, Ishihara Daisuke, Irifune Hidetoshi, Shima Takahiro, Kato Koji, Maeda Takahiro, Ito Takumi, Handa Hiroshi, Akashi Koichi, Kikushige Yoshikane	4. 巻 135
2. 論文標題 Aromatase is a novel neosubstrate of cereblon responsible for immunomodulatory drug-induced thrombocytopenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2146 ~ 2158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019003749	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 Hatakeyama Kiwamu, Hieda Michinari, Semba Yuichiro, Moriyama Shohei, Wang Yuqing, Maeda Takahiro, Kato Koji, Miyamoto Toshihiro, Akashi Koichi, Kikushige Yoshikane	4. 巻 4
2. 論文標題 TET2 Clonal Hematopoiesis Is Associated With Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Patients With Lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JACC: CardioOncology	6. 最初と最後の頁 141 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacc.2022.01.098	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 Kikushige Yoshikane	4. 巻 112
2. 論文標題 TIM 3 in normal and malignant hematopoiesis: Structure, function, and signaling pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3419 ~ 3426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15042	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0件

〔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
研究 分 担 者	赤司 浩一 (Akashi Koichi) (80380385)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

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