

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	遺伝学的スクリーニングを用いたCRBNの細胞内局在が多発性骨髄腫に対する抗がん剤pomalidomideの薬理作用に与える影響の解析
Title(English)	
著者(和文)	舘野峻平
Author(English)	Shunpei Tateno
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11544号, 授与年月日:2020年5月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山口 雄輝,川上 厚志,立花 和則,白木 伸明,小倉 俊一郎,田川 陽一
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11544号, Conferred date:2020/5/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)
(Dissertation Doctorate)

論文要旨

(和文2000字程度)

Dissertation Summary (approx. 2000 characters in Japanese)

報告番号 For administrative use only	乙 第 号	氏 名 Name	舘野 峻平
---	-------	-------------	-------

(要 旨)

pomalidomideはCRBN modulatorsと呼ばれるthalidomide誘導体の一つであり、thalidomideより強力な薬理作用をもつ。かつて催眠鎮静剤として販売されたthalidomideは、その催奇形性により市場から撤退した。しかしながら、近年になり抗がん作用や免疫調整作用を合わせ持つことが判明して再び注目され、現在では難治性だったハンセン病や多発性骨髄腫に対する優れた治療薬として処方されている。

thalidomideやpomalidomideはCereblon (CRBN) との結合を介して催奇形性や抗がん作用を発揮することが明らかになっている。CRBNはRing box 1 (ROC1)、Damaged DNA binding protein 1 (DDB1)、Cullin 4A/B (CUL4A/B) とともにE3ユビキチンリガー複合体を構成し、ユビキチン化基質の認識部位として働き基質の分解を誘導するが、用いる薬剤によってCRBNのユビキチン化基質が変化することが知られている。例えばCRBNはIMiDs依存的に転写因子Aiolosや転写因子Ikarosを、レナリドマイド特異的にリン酸化酵素casein kinase 1 alpha 1 (CK1 α)、CC-885特異的に翻訳因子G1 to S transition 1 (GSPT1) をユビキチン化し分解に導く。CRBN modulatorの標的はいずれもCRBNであるため、CRBNの制御機構を解明することは極めて重要である。しかしながらこれまでの研究は生化学的解析が中心であり、CRBN modulatorsの多岐に渡る薬理作用の全体像をつかむことはできていない。そこで本研究では多発性骨髄腫に対するpomalidomideの抗増殖作用を指標とした遺伝学的スクリーニングによって、CRBNの関与する分子機構の全容解明を目指した。

本研究では人遺伝子を網羅的にノックダウンできるRNAiライブラリを用いた大規模スクリーニングにより、pomalidomide感受性に関与する候補遺伝子を探索した。ライブラリには約15,000遺伝子に対する約82,500 shRNAが含まれている (1遺伝子につき約5 shRNA)。今回、スクリーニングの指標にはpomalidomideの多発性骨髄腫細胞に対する抗細胞増殖作用を用いてpomalidomideの抗がん作用に関わる因子を網羅的に同定し、CRBNの分子機構の全容を解明することを目指した。

RNAiライブラリをパッケージングしたレンチウイルスライブラリを調製し、多発性骨髄腫細胞株OPM-2に感染させた後、5日間pomalidomide処理した細胞からゲノムを回収し、各shRNAを発現する細胞数を次世代シーケンサーにより定量した。pomalidomideの薬効に関わる遺伝子に対するshRNAが導入された細胞ではpomalidomide感受性が変化し、pomalidomide処理条件での細胞の存在割合、すなわちリード数が増加または減少すると考えられる。シーケンシングデータは同じ遺伝子に対するshRNAが複数あることを考慮して、最大変化値と偽陽性率を計算した。いずれかの指標で変化が検出された遺伝子として変動遺伝子を445遺伝子検出し、56遺伝子は両指標で検出された。変動遺伝子の中にはCRBN複合体の構成因子やユビキチン-プロテアソーム経路の遺伝子が複数得られただけでなく、Gene Ontology (GO) 解析ではRNAのスプライシングや翻訳、更には核内輸送に関わるGOも濃縮された。

核内輸送がpomalidomideの感受性に与える影響を調べるため、変動遺伝子に含まれる積荷タンパク質の核内輸送を行うインポーチン β familyのkaryopherin beta 1 (KPNB1) とimportin 11 (IPO11) を個別にノックダウンし、pomalidomideの標的であるCRBNや、pomalidomide依存的ユビキチン化基質であるAiolosの局在を調べた。通常状態では核と細胞質の両方に存在するCRBNが、IPO11ではなくKPNB1をノックダウンすると細胞質に局在した。一方でAiolosは通常状態、インポーチンのノックダウンをした状態の両方で核に局在した。これらの細胞にpomalidomideを処理したところ、CRBNとAiolosの両方が核で存在するコントロールやIPO11ノックダウンではpomalidomide依存的にAiolosが分解されたが、KPNB1をノックダウンし核のCRBNが減少した状態ではAiolosの減少が抑えられた。

CRBNの局在変化がpomalidomide依存的なAiolosの分解に影響を与えるかを確かめるため、野生型、核局在シグナル (NLS)、もしくは核外輸送シグナル (NES) を融合したCRBNを内在性のCRBNをノックアウトした293Tに導入し、pomalidomideによるAiolosの分解を調べた。Aiolosと核で共局在する野生型やNLS融合CRBN発現細胞でのみpomalidomide依存的なAiolosの分解がみられたことからCRBNとユビキチン化基質のAiolosの局在の一致が重要であることがわかった。

本遺伝学的スクリーニングにより得られた変動遺伝子群は、生化学的解析からpomalidomideの薬効に関与すると報告されたものが多く含まれていた。生化学と遺伝学的スクリーニングの結果が見事に一致したこと

から、本スクリーニングの成功が示唆されたとともに、過去の知見が補強された。また、インポーチンによるCRBNの細胞内局在制御がpomalidomideを始めとするCRBN modulatorの感受性に関与するという新たな知見は治療標的である難治性疾患において新たな治療法の開発の手掛かりとなり得るだろう。そして、GO解析により得られたRNAのスプライシングや翻訳といった遺伝子発現の経路がpomalidomideの薬効に重要であるという新たな知見は、pomalidomide作用機構の詳細な解析を進める上で重要な手掛かりとなりうる。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note: Dissertation summaries must be written in either of the following formats: (A) both in Japanese (approx. 2000 characters) and in English (approx. 300 words), or (B) in English (approx. 800 words).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Important: Dissertation summaries will be published online on the Tokyo Tech Research Repository (T2R2). Do not include information treated as confidential under certain circumstances.

(論文博士)
(Dissertation Doctorate)

論 文 要 旨 (英 文) (300語程度)

Dissertation Summary (approx. 300 words in English)

報告番号 For administrative use only	乙 第 号	氏 名 Name	舘野 峻平 Tateno, Shumpei
(Summary) Pomalidomide, a derivative of thalidomide called CRBN modulator, is an effective treatment for multiple myeloma. The drug exerts its effects through cereblon (CRBN), a component of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4^{CRBN}. Other CRBN modulators directly interact with CRBN and change its substrate specificity. Toward comprehensive understanding of this intracellular pathway, which is regarded as a promising target of next-generation drug development, I performed a genome-wide shRNA library screen using anti-multiple myeloma activity of pomalidomide as an index. shRNA library screening identified 445 genes as those affecting pomalidomide sensitivity. Genes encoding components of the ubiquitin-proteasome pathway, such as subunits of the CRL4^{CRBN} complex, the COP9 signalosome, and the 26S proteasome, were among the pomalidomide-affecting genes. This result supported success of our screening and are consistent with previous studies. In addition, Karyopherin beta 1 (KPNB1) was identified as a novel pomalidomide-affecting gene. KPNB1 was required for the nuclear import of CRBN and for the CRBN-directed, pomalidomide-dependent degradation of a clinically relevant substrate, the transcription factor Aiolos. By contrast, the cytoplasmic translation factor G1 to S transition (GSPT1) was degraded following treatment with the thalidomide derivative CC-885 only when CRBN was present in the cytoplasm. These results indicate that subcellular distribution of CRBN is critical for the efficacy of CRBN modulators, and manipulation of the subcellular distribution of CRBN could be a new clinical approach for increasing pharmacological efficacy of CRBN modulators.			

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note: Dissertation summaries must be written in either of the following formats: (A) both in Japanese (approx. 2000 characters) and in English (approx. 300 words), or (B) in English (approx. 800 words).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Important: Dissertation summaries will be published online on the Tokyo Tech Research Repository (T2R2). Do not include information treated as confidential under certain circumstances.