

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成29年度採択分  
平成30年3月28日現在

脳神経幹細胞の増殖分化を制御するサリドマイド標的セレ  
ブロンの新規作動薬の探索

Search for novel modulators of cereblon, the target  
of thalidomide that regulates neural stem cell  
proliferation and differentiation

課題番号：17H06112

半田 宏 (HANDA HIROSHI)

東京医科大学・医学部・特任教授



研究の概要

サリドマイド催奇性のターゲットとしてセレブロン (CRBN) を単離・同定し、CRBN が脳神経幹細胞の発達を制御することを発見した。本研究では、その制御メカニズムを解明し、CRBN を介して神経幹細胞の増殖分化を制御する低分子化合物 (CRBN 作動薬) を開発し、ヒト脳神経疾患の治療や脳再生医療の実現に向けて新たな技術開発を目指す。

研究分野：生体分子科学・生物分子科学

キーワード：活性発現の分子機構

1. 研究開始当初の背景

我々は独自開発のアフィニティビーズ技術を用いて、サリドマイド催奇性の標的因子セレブロン (CRBN) を世界に先駆けて同定し、それが E3 ユビキチンリガーゼの基質受容体であることを解明した (Science, 2010)。また、米国 Celgene 社との国際産学連携研究により、サリドマイドを含む免疫調節薬 (IMiDs) の抗がん作用や免疫調節作用への CRBN の関与と、その作用機構を解明した。さらに、急性骨髄性白血病に治療効果のある新規誘導体 CC-885 を見出し、その作用機構を解明した (Nature, 2016)。また、CRBN を介して薬効を発揮するサリドマイド誘導体「CRBN 作動薬」が各作動薬に固有な基質を CRBN 上にリクルートし、ユビキチン化・分解を導くことを解明した (Nature, 2015)。CRBN は軽度精神遅滞の原因候補遺伝子として報告され、脳の発達や高次機能への関与が示唆される。CRBN の脳発生・発達への役割を理解するため、ゼブラフィッシュ胚をサリドマイド処理すると、脳発達が阻害され、CRBN を介する脳萎縮や神経幹細胞数の減少が引き起こされた。また、CRBN を発現抑制するとサリドマイド処理と同様に脳は萎縮し、逆に CRBN を過剰発現すると、脳のサイズが拡大し、神経幹細胞数が増加した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CRBN が脳の発生・発達に果たす役割を理解し、脳神経幹細胞の増殖分化

を制御する新規 CRBN 作動薬を探索・同定し、その CRBN 作動薬に特異的な基質タンパク質を同定し、CRBN 作動薬の作用機序を明らかにすることであり、CRBN を介して脳神経幹細胞の増殖分化を制御し、医療に貢献できる新たな技術基盤を確立する。

3. 研究の方法

①各種ゼブラフィッシュトランスジェニックシステムを用いて、CRBN 作動薬の処理や、CRBN の発現抑制・過剰発現が脳の発生・発達過程に与える影響を検討し、発現が変動する遺伝子群をトランスクリプトームおよびプロテオーム解析により同定する。そのサンプル調製に微量高速遠心機一式、定量的解析に MS 機器・ゲル撮影装置、多検体解析にマルチモードマイクロプレートリーダーを購入した。また、神経幹細胞の増殖・分化を制御する CRBN 下流因子群を同定する。②ゲノム編集によりヒト化ゼブラフィッシュを作製し、機能的相同性を明らかにした上で、③神経幹細胞の増殖分化を誘導する新規 CRBN 作動薬をケミカルライブラリーから同定し、化学構造を決定するため核磁気共鳴装置を購入した。次に、④アフィニティナノビーズ技術により、新規 CRBN 作動薬の固有な基質タンパク質を単離・同定を試みる。その際、ヒト培養神経幹細胞から抽出液を作製し、CRBN 作動薬に依存する CRBN の新規基質タンパク質の単離・同定を行う。

#### 4. これまでの成果

①各種ゼブラフィッシュトランスジェニック系統とヒト神経幹細胞株を用いて、CRBN 作動薬の処理や、CRBN の発現抑制・過剰発現がゼブラフィッシュの脳発生・発達やヒト神経幹細胞の遺伝子発現に及ぼす影響をトランスクリプトーム・プロテオームレベルで解析し、CRBN を介した脳神経幹細胞の増殖分化制御機構の解明を進めている。特に、トランスクリプトーム解析の結果が出始めており、再現性の検討を行っている。また、神経幹細胞の増殖分化を制御する CRBN 下流因子の同定も試みている。

②ゲノム編集によりヒト化ゼブラフィッシュを作製し、トランスジェニック系統を確立した。これからヘテロ接合体からホモ接合体を作出するところである。

③神経幹細胞の増殖分化誘導能を持つ CRBN 作動薬を既に同定しており、それよりも活性の強い化合物をケミカルライブラリーからスクリーニングしている。ゼブラフィッシュトランスジェニック系統を用いたスクリーニングにより候補化合物が1つ得られたが、より活性の高い化合物の同定を目指して、再度スクリーニングを行っている。

④アフィニティナノビーズ技術により、新規 CRBN 作動薬に特異的な基質タンパク質の単離・同定を試みている。ゼブラフィッシュのスクリーニング系で得られた高活性 CRBN 作動薬を用いて、iPS 由来ヒト神経幹細胞粗抽出液から、CRBN 作動薬に依存して CRBN と相互作用する基質候補タンパク質の単離・同定を行っている。精製画分の全タンパク質をプロテオーム解析し、基質候補タンパク質がいくつか得られているが、まだ予備的な段階であり、得られたものが真の基質であることの証明や、他の基質タンパク質の探索を並行して行っている。

#### 5. 今後の計画

初年度はほぼ計画通りに進んでおり、古くから論争が続いていたサリドマイド光学異性体 (S 体と R 体) の活性の違いに関する問題を解決した (Sci Rep, 2018)。現在、CRBN が脳神経幹細胞の増殖分化に関与することを明確にし、その作用機構の解明を行っている (論文投稿準備中)。さらに、脳の発生過程だけでなく、成体脳の神経幹細胞における効果を検討している。

本研究の開始時、我々は既に CRBN を介して脳神経幹細胞の増殖分化をコントロールできる化合物を1つ同定していたが、それよりも高活性の CRBN 作動薬を見出した。この化合物に特異的な新規基質の同定を通して高活性 CRBN 作動薬の作用機構を解明するとともに、より高活性な CRBN 作動薬の同定を試み、脳神経幹細胞の増殖分化を制御し、ヒトの脳疾患の治療や脳の再生医療に役立つ

技術開発を目指す。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

・Mori, T., Ito, T., Liu, S., Ando, H., Sakamoto, S., Yamaguchi, Y., Tokunaga, E., Shibata, S., **Handa, H.** and \*Hakoshima, T., Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. *Sci. Rep.*, 8, 1294 (2018)

・Bocchitto, M., Lee, N., Sakamoto, S., Spruce, L., **Handa, H.**, Clardy, J., Seeholzer, S. and \*Kalb, R., Neuroprotective Marine Compound Psammaplysene A Binds the RNA Binding Protein HNRNPK. *Mar. Drugs*, 15, 246 (2017)

・Dohi, T., Sasa, H., Miyazaki, K., Fujitake, M., Takenaga, N. and \*Kita, Y., Chiral Atropisomeric 8,8'-Diiodobinaphthalene for Asymmetric Dearomatizing Spirolactonizations in Hypervalent Iodine Oxidations., *J. Org. Chem.*, 82, 11954-11960 (2017) (Hypervalent Iodine Reagents Special Issue)

・Dohi, T., Koseki, D., Sumida, K., Okada, K., Mizuno, S., Kato, A., Morimoto, K. and \*Kita, Y., Metal-Free O-Arylation of Carboxylic Acid by Active Diaryliodonium(III) Intermediates Generated in situ from Iodosoarenes. *Adv. Synth. Cat.*, 359, 3503-3508 (2017)

・Ogasawara, M., Sasa, H., Hu, H., Amano, Y., Nakajima, H., Takenaga, N., Nakajima, K., **Kita, Y.**, Takahashi, T. and \*Dohi, T., Atropisomeric Chiral Diiododienes (Z,Z)-2,3-Dic(1-iodoalkylidene)tetralin s: Synthesis, Enantiomeric Resolution, and Application in Asymmetric Catalyst. *Org. Lett.*, 19, 4102-4105 (2017)

・Morimoto, K., Koseki, D., Dohi, T. and \*Kita, Y., Oxidative Biaryl Coupling of N-Aryl Anilines by Using a Hypervalent Iodine(III) Reagent. *Synlett*, 28, 2941-2945 (2017)

・Morimoto, K., Dohi, T. and \*Kita, Y., Metal-Free Oxidative Cross-Coupling Reaction of Aromatic Compounds Containing Heteroatoms. *Synlett*, 28, 1680-1694 (2017)

・**半田宏**、「2017年度島津賞」受賞、2017.12.8

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/nanoparticle/index.html>