

サリドマイド催奇性の分子機構

1. はじめに

サリドマイドは1957年に旧西ドイツのグリュネンター社により鎮静剤として販売された。当初はヒトにおいても齧歯類を用いた動物実験においても特に目立った副作用もなかったことから、40か国以上で処方された。しかし、1961年に催奇性を有していることが報告され、サリドマイドは市場からの撤退を余儀なくされた。サリドマイドを妊娠3-8週目の妊婦が服用すると、新生児の四肢や耳に催奇性が生じる。このようなサリドマイド児は全世界において1万人以上誕生したといわれている¹⁻⁴⁾。

深刻な副作用を有するサリドマイドであるが、近年になりハンセン病や多発性骨髄腫といった難病に対し著しい改善効果を有していることが分かり、再評価が進んでいる。ハンセン病への処方については米国食品医薬品局 (FDA) が1998年に認可を出しており、また多発性骨髄腫に対しては2006年にFDAが、そして2008年には我が国においても認可された。いずれの処方においても、厳格な統制下におかれている¹⁻⁴⁾。

なぜサリドマイドに上記のような催奇形性があるのだろうか。数多くの研究者によってこの命題は取り組まれてきたが、長い間、催奇性の引き金を引く直接の標的因子は未解明であった。我々は、ごく最近、サリドマイド結合因子セブレロンを発見し、それが催奇性の主要な標的因子であることをゼブラフィッシュおよびニワトリを用いた動物実験により立証した⁵⁾。

本稿では、これまでの主要なサリドマイド催奇性研究の流れを紹介した上で、我々によるサリドマイド催奇性の標的因子の同定がどのようになされたのかについて説明していきたい。

2. これまでのサリドマイド催奇性研究

サリドマイド催奇性は四肢、耳、内臓の異常、自閉症など多岐にわたる。特に高頻度であるのが四肢の形態異常であり、耳の異常がそれに次ぐ。四肢形成の異常は、アザラシ奇形と呼ばれる短肢症 (phocomelia) や、より深刻な無肢症 (amelia) により特徴づけられる。耳の異常は、小耳症や無耳症、そして聴覚障害による。催奇性はヒトだけで

なく、サルやウサギ、ニワトリ、そしてゼブラフィッシュにおいても引き起こされる。しかし、未だ不明な理由により齧歯類においては生じない¹⁻⁴⁾。

サリドマイドの四肢形成の異常においては、数多くの研究者たちが取り組んでおり、これまでに30以上の仮説が提唱されている。その中には、実験によって部分的にも裏付けられているものから、推測にとどまっているものまでさまざまである。その中で、サリドマイドによる血管新生阻害が催奇性の原因であるという仮説および、酸化ストレスが原因であるという二つの仮説は、いくつかの独立した研究グループによって支持する証拠が出され、データが蓄積されている⁶⁾。

サリドマイドによる血管新生阻害活性は、1994年にD'Amatoらにより報告された⁷⁾。ウサギの網膜にFGF-2を処理することにより血管新生を誘導することができるが、サリドマイドがそれを阻害するというものであった。この実験は別のグループによっても再現され、また血管新生阻害は近年注目されているサリドマイドによる抗腫瘍効果の説明にもつながることから精力的に取り組まれているテーマである^{1,2)}。2009年には、Therapontosらにより血管新生阻害が四肢形成の原因であると主張する報告も出された⁸⁾。しかし、サリドマイドがいかなる因子に結合することで血管新生阻害が引き起こされるのかは明らかではなく、また催奇性が四肢など特異的な部位に生じるのはなぜかについてはまだ十分な説明がなされていない。

サリドマイドによる酸化ストレスの発生はParmanらにより1999年に報告された⁹⁾。ウサギを用いた実験により、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) が発生することを示し、さらには酸化ストレス防止剤により催奇性が軽減されることも示していた。この現象は、ニワトリ胚を用いた解析によっても示され、サリドマイドにより発生したROSが四肢における細胞においてアポトーシスを誘導し、それにより催奇性を引き起こすというモデルが提唱された^{4,10)}。しかし、なぜ酸化ストレスで四肢など部位特異的に形態異常が生じるのかという問題については未だ解決を示す報告は出されておらず、またいかなるプロセスで酸化ストレスが発生するのかはよく分かっていない。

両モデルにおいて、サリドマイドにおける催奇性の重要な局面を明らかにしていることは間違いがないが、サリドマイドによる機序の最上流、すなわち直接作用を及ぼす結合因子は報告されておらず、また組織特異性の問題も解決していなかった。

3. サリドマイド結合因子セレブロンの同定

サリドマイド催奇性の分子機構を明らかにするために、その結合因子を明らかにしなければならない。その点において、我々の研究室は薬剤結合因子を選択的に単離・精製できるアフィニティ担体の開発を行っていた。我々はワンステップ精製による短時間分離を可能とする、スチレン・グリシジルメタクリレート (GMA) を共重合体として核に持ち、ポリ GMA が被覆された粒径約 200nm の SG ビーズを開発していた。そして、抗炎症剤 E3330 や抗がん剤メトトレキサートの新規標的の同定などを報告してきた。そしてさらに最近になり、磁性鉄であるフェライトがさらに包含された磁性微粒子 FG ビーズを開発した (図 1 A)。FG ビーズでは、磁気分離が可能で、遠心機を用いずともアフィニティ精製が可能である¹¹⁾。

我々はこの FG ビーズにサリドマイドを固定化し、様々なヒト細胞株抽出液からアフィニティ精製を行うことを試みることににより、サリドマイド結合因子セレブロン (cereblon, CRBN) の単離・同定に成功した (図 1B)⁵⁾。またその際に、damaged DNA binding protein 1 (DDB1) がセレブロン結合因子として共精製されていた。

4. ユビキチンリガーゼ構成因子であるセレブロン

セレブロンは 442 個のアミノ酸からなるタンパク質であ

り、植物からヒトに至るまで進化的に保存されている。2004 年に軽度精神遅滞の原因候補因子として報告されたが、今日に至るまでその細胞内機能や生理機能についてはほとんど分かっていなかった¹²⁾。

一方で、セレブロンに結合していた DDB1 については、比較的良好に知られている。DDB1 は元々 DNA 修復機構の一つであるヌクレオチド除去修復に関する因子として報告されたが、近年の蓄積された実験証拠より、現在ではタンパク質分解系であるユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) における E3 ユビキチンリガーゼ複合体のサブユニットとして機能することが判明している。UPS において E3 ユビキチンリガーゼは分解されるべき基質にポリユビキチン鎖を付加する反応を触媒する。DDB1 は Cullin 4A (Cul4: Cul4A もしくは Cul4B), regulator of cullins-1 (Roc1) および基質レセプターと E3 複合体を形成している。Cul4 および Roc1 は E2 と相互作用しユビキチン反応の触媒活性を担い、基質レセプターは基質との結合を担う。基質レセプターは damaged DNA-binding protein 2 (DDB2) や cockayne syndrome group A (CSA) などが知られており、それぞれ担当する基質は異なる¹³⁾。

セレブロンが DDB1 と結合する以上、E3 複合体の新規構成因子である可能性があると考えた我々は、セレブロンが Cul4A や Roc1 と相互作用するかどうかを検証した。FLAG-HA エピトープタグをつけたセレブロンを安定的に

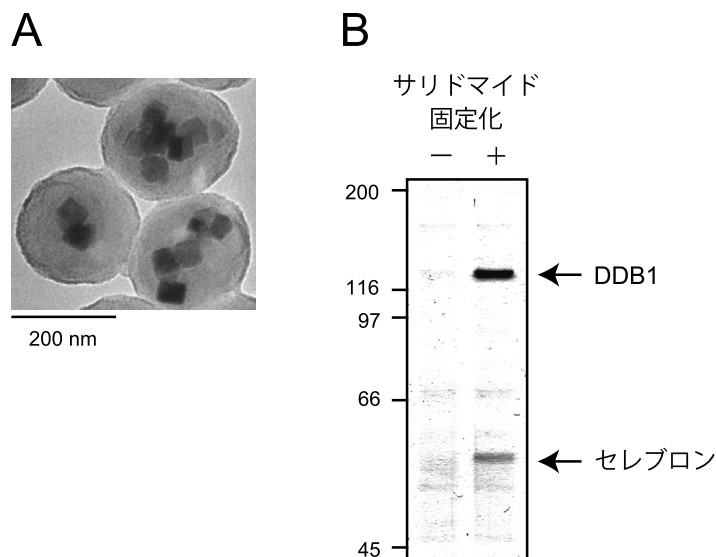


図 1 サリドマイド結合因子セレブロンの単離・同定

A. FG ビーズの電子顕微鏡写真。B. サリドマイド固定化 FG ビーズを用いたアフィニティ精製により、ヒト細胞株抽出液より DDB1 とセレブロンが単離・同定された。

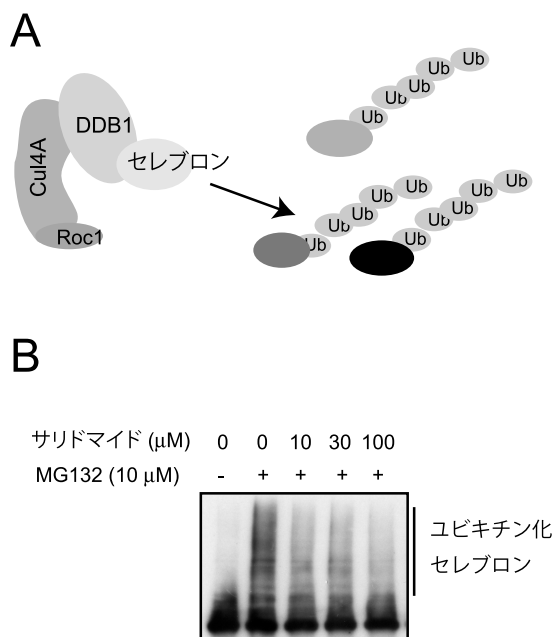


図2 サリドマイドによるセレブロン機能の阻害
A. セレブロンはDDB1, Cul4A, Roc1と複合体を形成する。
B. セレブロンの自己ユビキチン化反応をサリドマイドは濃度依存的に阻害する。MG132はプロテアソーム阻害剤を表す。文献5) Ito et al., Science (2010) を改変。

発現する293T細胞株を樹立し、その抽出液よりFLAG免疫沈降を実施した。結果としてセレブロンがDDB1の他Cul4A, Roc1と結合することが判明した。またセレブロン複合体にユビキチン活性が存在することも示した(図2A)。さらには、サリドマイドがそのユビキチン活性を阻害することも判明した(図2B)。サリドマイドはE3阻害剤であることが示唆された。

5. サリドマイド催奇性における標的因子セレブロン

次に、動物を用いることでセレブロンが本当にサリドマイド催奇性に関連するかどうかを検証した。我々は、最初にゼブラフィッシュを用いることにした。ゼブラフィッシュは—(1)体が透明で観察が容易で、しかも発生が早い。(2)遺伝子発現抑制や強制発現が容易。(3)多個体処理が容易に実現可能。—といった利点がある。またゼブラフィッシュにはヒトセレブロンと70%の相同性を持つホモログ(zCrbn)が存在している。

まずゼブラフィッシュにおいてサリドマイド催奇性が再現するかどうかを検証した。胚よりプロテアーゼで卵殻を除去し、そのうえでサリドマイド入りの培地で薬浴させた。結果として胸びれ(四肢に相当)の縮退や、耳の縮小

などが見られた。そこで、モルフォリノアンチセンス法によりzCrbnの翻訳を抑制することを試みたところ、サリドマイド処理と類似した形質が生じることが分かった。これらの結果よりzCrbnはサリドマイド催奇性と強く関連していることが示唆された。

では、これらの形質が偶然の一致ではなく、本当にzCrbnがゼブラフィッシュにおける催奇性とリンクしていることを示すためには、いかなる実験をすればよいだろうか。もしセレブロンがサリドマイドの真の標的であれば、機能を保持しながらサリドマイド非結合型のセレブロン変異体を発現させた動物においては催奇性耐性になるはずである。我々はサリドマイド非結合型変異体を探索し、セレブロンの384番目のチロシンおよび386番目のトリプトファンがアラニンに置換されたYW/AA変異体を見出すことに成功した。この変異体はユビキチン活性を有しながら、サリドマイドによる阻害を受けない(図3A)。我々はゼブラフィッシュにおけるzCrbnにおいても同様の変異体zCrbn^{YW/AA}を作成した。そしてゼブラフィッシュに発現させ、サリドマイド処理を行った。期待通り、zCrbn^{YW/AA}を導入した胚においては催奇性が抑えられることが分かった(図3B)。

最終的に、我々はニワトリ胚においても同様の結果が再現されるかどうかを検証した。ニワトリは長年サリドマイド研究で用いられている歴史あるモデル動物であり、また四肢の構造はヒトのものと高い相同性がある。ニワトリ胚の前肢は、サリドマイドを処理することにより、その形成が強く阻害される。しかしヒトのセレブロン^{YW/AA}変異体発現プラスミドをエレクトロポレーション法により導入したニワトリ胚においては、ゼブラフィッシュの時と同様に、その催奇性が抑えられるという結果が得られた(図3B)。

以上の実験結果を統合し、サリドマイドはセレブロンと結合し、その機能を阻害することによって(まだ未同定の)基質が異常に蓄積し、それが結果として催奇性を引き起こすという結論を得た(図3C)。

6. 終わりに

我々の研究により、サリドマイド催奇性における主要な標的因子セレブロンが同定された。しかしサリドマイド催奇性についての全容が分かったわけではなく、まだいくつも問題が残されている。セレブロンの発見により、組織特異性の問題が解決できただろうか。ヒトにおいてセレブロン^{YW/AA}の発現はユビキタスである¹⁴⁾。四肢や耳に組織特異的な

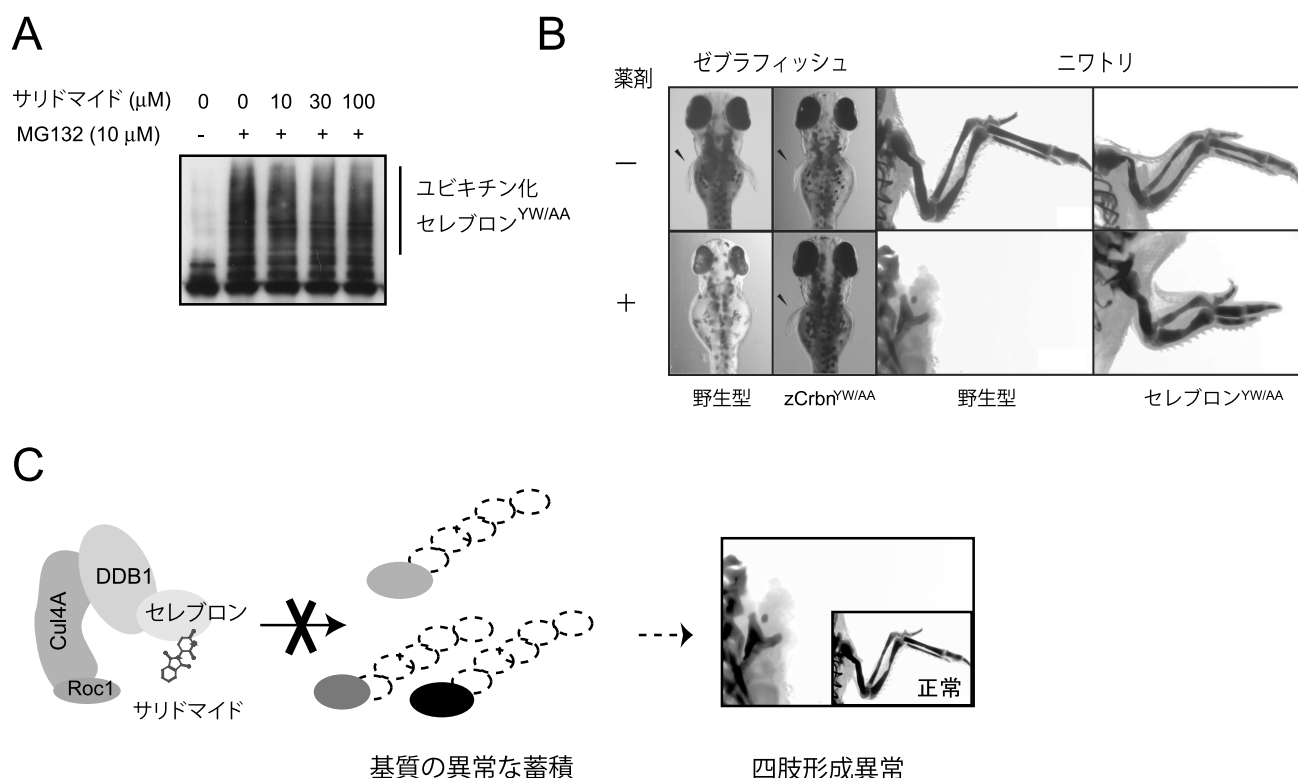


図3 サリドマイド催奇性とセレブロン

A. セレブロン^{YW/AA}において、図2Bと同様の実験を行ったところサリドマイドは自己ユビキチン化を阻害しない。YW/AAは384番目のチロシンおよび386番目のトリプトファンをアラニンに置換した変異体を示す。B. zCrbn^{YW/AA}もしくはセレブロン^{YW/AA}をそれぞれゼブラフィッシュおよびニワトリに発現させたところ、サリドマイドによる催奇形性を抑制する。C. サリドマイドによる催奇形性の分子機構のモデル。サリドマイドがセレブロンを含むE3ユビキチンリガーゼに結合すると、その機能は阻害され、基質の異常な蓄積を招く。その結果として、四肢形成異常など催奇形性が生じる。

文献5) Ito et al., Science (2010) を改変。

セレブロン下流シグナル伝達があるのかを今後明らかにしていく必要がある。またセレブロンはE3ユビキチンリガーゼとして機能することを示したが、そのターゲットである基質はいかなるものだろうか。セレブロンの既存仮説(血管新生阻害や酸化ストレス)ともどう関わるのか気になるところである。そして、セレブロンが催奇性の原因因子であることは判明したが、ハンセン病や多発性骨髄腫への治療効果とは関係するのだろうか。

最後の問いについて、もしセレブロンが催奇性のみに関係し、治療効果に関係ないのであれば、今後セレブロンと結合しないサリドマイド誘導体の開発を目指すべきである。また、もしセレブロンが治療効果にも関係するのであれば、セレブロンの基質の下流シグナル伝達を検証し、主作用と副作用の分岐点を明らかにする必要がある。今後、これらの問題に一つ一つ取り組み、催奇性が軽減されたより安全で有用な新薬の開発に貢献していきたい。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、東京工業大学大学院生命理工学研究科の安藤秀樹特任助教および東北大学加齢医学研究所の小椋利彦教授、鈴木孝幸助教らとの共同研究により達成されたものである。この場を借りて感謝する。

- 1) Melchert, M. & List, A. (2007) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 1489–1499.
- 2) Franks, M.E., Macpherson, G.R., & Figg, W.D. (2004) *Lancet*, **363**, 1802–1811.
- 3) Miller, M.T. & Stromland, K. (1999) *Teratology*, **60**, 306–321.
- 4) Knobloch, J. & Ruther, U. (2008) *Cell Cycle*, **7**, 1121–1127.
- 5) Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y., & Handa, H. (2010) *Science*, **327**, 1345–1350.
- 6) Hansen, J.M. & Harris, C. (2004) *Antioxid. Redox. Signal.*, **6**, 1–14.
- 7) D'Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E., & Folkman, J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 4082–4085.

- 8) Therapontos, C., Erskine, L., Gardner, E.R., Figg, W.D., & Vargesson, N. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 8573-8578.
- 9) Parman, T., Wiley, M.J., & Wells, P.G. (1999) *Nat. Med.*, 5, 582-585.
- 10) Knobloch, J., Shaughnessy, J.D., Jr., & Ruther, U. (2007) *FASEB. J.*, 21, 1410-1421.
- 11) Sakamoto, S., Kabe, Y., Hatakeyama, M., Yamaguchi, Y., & Handa, H. (2009) *Chem. Rec.*, 9, 66-85.
- 12) Higgins, J.J., Pucilowska, J., Lombardi, R.Q., & Rooney, J.P. (2004) *Neurology*, 63, 1927-1931.
- 13) Lee, J. & Zhou, P. (2007) *Mol. Cell.*, 26, 775-780.
- 14) Su, A.I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K.A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M.P., Walker, J.R., & Hogenesch, J.B. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 6062-6067.

伊藤 拓水, 半田 宏

(東京工業大学ソリューション研究機構)

Molecular mechanism of thalidomide teratogenicity
Takumi Ito and Hiroshi Handa (Solutions Research Laboratory, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuda-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan)

脂質膜存在下での膵島アミロイドポリペプチドのアミロイド線維形成と膜破壊

1. はじめに

アミロイド線維 (医学用語として“繊維”ではなく“線維”を用いる) は, タンパク質の規則構造をもつ凝集体であり, 生体内でのその沈着は, アルツハイマー病, 透析アミロイドーシス, クロイツフェルトヤコブ病やウシ海綿状脳症 (狂牛病) などのプリオン病, 2型糖尿病などの様々な疾患 (アミロイド病) と関わっている. アミロイド線維は, 線維軸に垂直に並んだ β ストランドが積み重なって形成されるクロス β シートと呼ばれる特異的な規則構造をとる¹⁾. 現在アミロイド線維が形成される詳細な分子機

構は解明されていない. どのようにタンパク質がアミロイド線維を形成し, 疾病を引き起こすのか? 本稿では, 2型糖尿病患者に見られるアミロイド線維を例にとり, モデル脂質膜存在下でのその形成過程と膜破壊について解説する.

2. 2型糖尿病とIAPPアミロイド線維

2型糖尿病患者のインスリンを分泌する膵 β 細胞の近傍に不溶性の沈着物が形成されることが, 100年以上前の1900年頃から知られていた. この沈着物の主要成分が37残基のペプチドから形成されたアミロイドであると明らかになったのは1987年で, WestermarckとCooperのグループがそれぞれ独立に行った研究による²⁾. このペプチドは, 膵島アミロイドポリペプチド (islet amyloid polypeptide) と呼ばれ, IAPP, または amylin と簡略化される (本稿ではIAPPを用いる). IAPPは, インスリンと同様に β 細胞内で産生され, 同じ応答でインスリンと共に分泌される. IAPPは, 様々なプロセス (糖質代謝, インスリン分泌の調節, 骨吸収の阻害, 胃内容排出の抑制など) に関与していると報告されているが, その生理的役割は解明されていない²⁾. 現在, 50~90%以上の2型糖尿病患者の β 細胞近傍に, 何らかの原因でIAPPのアミロイド線維が形成されると報告されている^{2,3)}.

3. IAPPのアミロイド線維形成

IAPPは, ヒト以外の哺乳類においてもインスリンと共に β 細胞から分泌される. 図1に代表的な哺乳類のIAPPのアミノ酸配列を示す³⁾. ヒト, サル, ネコ, イヌのIAPPは, 試験管内アミロイド線維を形成する. また, ヒト, サル, ネコは, 加齢や肥満によって2型糖尿病を発症する (イヌは1型糖尿病を発症しやすい). 一方, ネズミ (ラットやマウス) などのゲッ歯類は, 自然界において2型糖尿病の発症は見られず, これらのIAPPは, 通常試験管内でアミロイド線維形成反応を起こさない. IAPPのアミロイド線維形成と糖尿病発症との詳細な因果関係は不明である

	1	10	20	30	37
ヒト	K	CNTATCATQ	RLANFLVH	SSNFGAIL	SSSTNVGSNTY
サル	.	.	.	R	 T D
ネコ	.	.	.	I R	 L P
イヌ	.	.	.	R T	 L P
ネズミ	.	.	.	R	 L . PV . PP

図1 代表的な哺乳類のIAPPのアミノ酸配列

2残基と7残基目のシステインがジスルフィド結合で結ばれ, C末端はアミド化されている. 示された哺乳類間でアミノ酸配列はかなり保存されているが, 残基18~29間に大きな配列の違いがある.