

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14348

研究課題名(和文)セロトニン神経に対するR体サリドマイドの薬理作用機序とその新規受容体探索

研究課題名(英文)Pharmacological actions of R-thalidomide on serotonin neurons

研究代表者

那波 宏之(Nawa, Hiroyuki)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：50183083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：サリドマイドは胃腸薬や睡眠薬として日本でも販売されたが、催奇性のために使用が禁じられた。その後サリドマイドがセレブロンに結合してユビキチン化を阻害することが明らかになった。しかし、サリドマイドの催眠作用、鎮静作用はセレブロンリガンドのレナリミドには見られないなど、そのセレブロンへの結合活性では説明できない。我々はサリドマイドの中樞作用メカニズムを解明する計画を以下に実施した。各種マウス脳スライス標本を用いて電気生理学的にセロトニン神経活動を薬物存在下で結果、サリドマイドには濃度依存的なセロトニン神経細胞に対する発火抑制活性があるが、セレブロン以外の受容体を介していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Thalidomide was sold in Japan as gastrointestinal drugs and sleeping pills, but it was considered teratogenic and was forbidden to use in September 1962. Professor Honda et al., 2010, revealed that thalidomide binds to the cereblon molecule constituting the ubiquitin ligase complex to inhibit ubiquitination. However, the hypnotic and sedative effects of thalidomide can not be mimicked by a cereblon ligand, lenalidomide. We attempted to elucidate the central action of this drug. Using various types of mouse brain slice preparations, we electrophysiologically assessed the pharmacological actions of the thalidomide derivatives or an ubiquitin-proteasome inhibitor and found that the central actions of thalidomide cannot be illustrated by its binding to cereblon.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：サリドマイド レナリドミド セレブロン ユビキチン セロトニン神経

## 1. 研究開始当初の背景

1950年代にサリドマイドは胃腸薬や睡眠薬として日本でも販売された。その後、催奇性と因果関係があるとされ、1962年9月に販売停止と回収が行われ、使用が禁じられた。近年になってらい性結節性紅斑治療薬や多発性骨髄腫などのがん治療薬としての注目が集まり、現在、一部臨床応用が認可されるにいたっている。2010年、半田宏教授らにより、サリドマイドがユビキチンリガーゼを構成するセレブロン (Cereblon) というタンパク質と結合してユビキチン化を阻害することが明らかになった。しかし、申請者らを含む多くの研究から、そのセレブロンの活性では説明できない複数のサリドマイドの中樞作用が確認されている。実際、上述以外にもサリドマイドには、エイズウイルスの増殖抑制活性、がん悪液質の改善効果、抗肥満作用、鎮静作用、抗精神病作用、フォスフォジエステラーゼ阻害作用など、多種多様な薬理作用とシグナル修飾作用を持つ。

半田教授らの研究からセレブロンはE3ユビキチンリガーゼであることが判明し、DDB1やCUL4A、ROC1と分子複合体を形成することで、標的蛋白のユビキチン化を行い、標的蛋白の分解を促すことが判明した。サリドマイドを含むフタルイミド誘導体にはR体とS体の鏡像異性体が存在するが、催奇性や抗がん作用はS体によるセレブロンの活性阻害に起因することが提唱されている。同じフタルイミド誘導体であるレナリドミド、ポマリドミドもこのセレブロンに結合し、そのユビキチンリガーゼの活性を阻害することも知られている。いまだセレブロンの標的分子の全貌はあきらかになっていないが、現在では、S体サリドマイドによるセレブロンユビキチン系の阻害作用こそが、催奇性や抗がん作用の本態であることが証明されている。一方、サリドマイドの中樞性の作用である催眠作用、鎮静作用はもう一方の光学異性体R体サリドマイドの作用であるといわれてきたが、そのメカニズムは不明のままである。このようにサリドマイドの中樞作用とセレブロンの関係、サリドマイドの中樞神経作用にはおおくの疑問があった。

## 2. 研究の目的

申請者らは延髄・縫線核のセロトニン神経からのin vitroスライス記録という光学異性の変換(ラセミ化)が起き難い状況で、(i)R体サリドマイドは強い神経発火抑制を引き起こすこと、(ii)類縁体のレナリドミドはこの活性が極めて弱いことを発見している。つまり、報告されているサリドマイドのセレブロンへの蛋白分解阻害活性では、このセロトニン神経抑制作用は説明しきれないことが判明した。そこで、今回、新規サリドマイド受容体の存在可能性を探索する本計画を立案

し、実施したのである。本研究では第一に「サリドマイドのセロトニン神経抑制作用はセレブロン遺伝子の有無に依存しない」という仮説を以下の3つの実験計画を立てて検討した。

1. セレブロンノックアウトマウスにおけるサリドマイドの中樞神経作用の解析
2. セレブロン亜型分子や蛋白修飾によるフタルイミド化合物の親和性変化の分析
3. サリドマイドとの結合実験とプロテオーム解析を通じた新規受容体の探索

## 3. 研究の方法

### 【動物】

全ての動物実験は新潟大学動物実験規則に従い、新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。実験動物の使用数は必要最小限となるよう努めた。実験には、9-11週齢の雄C57Bl/6N Crマウス(日本SLC)を用いた。

### 【脳スライス作製】

動物の麻酔はイソフルランを気化させた麻酔ガスにより行った。麻酔後、断頭し、素早く脳を摘出した。脳は直ちに95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>混合ガスで飽和した氷冷人工脳脊髄液(ACSF)中で冷却した後、ACSFで湿らせたろ紙上に移し、冠状断で大まかなトリミングを行った。ヴィブラトームのチャンパー上に脳を固定し、チャンパー内を95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>混合ガスで飽和した氷冷ACSFで満たし、縫線核を含む冠状断脳スライス(400μm厚)を作製した。スライスは、95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>混合ガスで飽和したACSF中のチャンパー内で、34-30分間、その後、室温30分間静置して回復させ、電気生理学的実験に用いた。

### 【細胞外記録】

スライスを記録用チャンパーに移動させ、実体顕微鏡下で背側縫線核(DRN)の位置を同定し、電極内液(0.5M NaCl)で満たした10-20Mのガラス電極を刺入した。記録用チャンパーには、95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>混合ガスで飽和したACSFを、30-32に保って2-4mL/minの速度で灌流した。セロトニン神経細胞の規則的な自発発火を促進するため、ACSF中には1μMのフェニレフリン(選択的1受容体刺激薬)を加えた。活動電位のdurationが短いもの(<1ms)、もしくは4Hz以上の頻度の発火は、セロトニン神経細胞の活動ではないと判定し、記録から除外した。

### 【サリドマイド誘導体の合成】

サントリー生命科学財団 生物有機化学研究所に共同研究を依頼して、サリドマイドのフタルイミド環アミノ基とポマリドミドのグルタミル環アミノ基に官能基を導入し、クロスリンク可能な分子に化学修飾を加えた。

## 4. 研究成果

【実験1】セロトニン核内神経細胞の自発活動への、サリドマイドとサリドマイド誘導体

## の急性作用

サリドマイドおよびサリドマイド誘導体のもつ、セロトニン神経細胞の自発活動に対する作用効果の強弱を比較し、各サリドマイド誘導体の薬剤間にどのような差があるかを調べた。加えてこの抑制作用は、GABA およびグルタミン神経細胞を介する作用かどうか、薬理学的に確認した。

サリドマイド、レナリドミド、ポマリドミドの濃度は、すべて 100  $\mu\text{M}$  で調整し、延髄スライス標本に灌流投与した。結果、サリドマイドとポマリドミドは、背側縫線核内神経細胞の自発活動頻度を低下させた。レナリドミドは、背側縫線核内神経細胞の自発活動頻度を低下させない。サリドマイドはグルタミン酸受容体・GABA 受容体阻害薬存在下でも、背側縫線核内神経細胞の自発活動を低下させた。このことは、サリドマイドのセロトニン神経に対する反応が、興奮性神経や抑制性神経を介する 2 次的反応ではないことを示唆した。

## 【実験 2】セロトニン神経細胞の自発活動へのサリドマイド光学異性体の急性作用

サリドマイドには (+) S-体、(-) R-体の 2 種類の光学異性体が存在するが、セロトニン神経細胞の自発活動に対する作用について、光学異性体間に違いがあるのかを調べる。旧来の定説によると、R 体サリドマイドに中枢性の催眠作用があるといわれていた。

結果、サリドマイドの光学異性体は (+) S-体、(-) R-体ともに、背側縫線核内神経細胞の自発活動頻度を低下させた。したがってサリドマイドの光学異性体間には、セロトニン神経作用に差は検出できないことが判明した。

## 【実験 3】ドパミン神経細胞、ノルアドレナリン神経細胞の自発活動へのサリドマイドの急性作用

サリドマイドの自発発火抑制作用はセロトニン神経だけに効果を発揮できるのかを検討するため、同じ発生源をもつ他のモノアミン神経の自発活動に対する作用を調べた。

マウス中脳や脳幹組織からスライス標本を作製し、青斑核内、背側縫線核内、黒質緻密部内の当該神経細胞をその神経活動パターンにより同定した。ユニット活動を記録しながら、100  $\mu\text{M}$  でサリドマイド誘導体を灌流投与して、ユニット活動の変化を測定した。その結果、サリドマイドは、青斑核内ノルアドレナリン神経や背側縫線核内セロトニン神経の自発活動を低下させるが、黒質緻密部内ドパミン神経の自発活動を低下させないことが判明した。

## 【実験 4】セレブロンハイポモルフマウスにおけるセロトニン神経細胞の自発活動に対するサリドマイドの急性作用

サリドマイドによる催奇形性は、サリドマイドがユビキチンリガーゼの構成因子であるセレブロンに特異的に結合し、その働きを阻害することによって生じる。サリドマイドのセロトニン神経の自発活動に対する作用が、催奇形性と同様のユビキチン：プロテアソーム系機序によって生じているのかをセレブロンハイポモルフマウスを用いて調べた。

同腹のマウス (Wild type、セレブロン K0) の背側縫線核内セロトニン神経のユニット活動を記録し、その反応を比較した。サリドマイドは、セレブロン K0 マウスのセロトニン神経の自発活動を低下させた。またそのサリドマイドの効果レベルは、wild type マウスに対する作用との間に、差を検出できなかった。

後日、この遺伝子改変マウスは完全なセロブロン発現欠損ではなく、20 分の 1 以下に発現低下を起こしているハイポモルフミュータントであることが判明した。そこでユビキチン：プロテアソーム系阻害の可能性を再度、否定するため、プロテアソーム阻害剤 (MG-132) がサリドマイド活性をミミックできるか検討した。しかし、本プロテアソーム阻害剤はセロトニン神経発火の抑制活性を発揮できなかった。ゆえに、サリドマイドのセロトニン活動抑制活性はセロブロンでは説明できないと結論された。

## 【実験 5】セロトニン神経細胞の自発活動への一酸化窒素の影響評価

既報によると、サリドマイドは弱い一酸化窒素合成酵素 NOS の阻害作用を持つとされる。サリドマイドのセロトニン神経細胞の自発活動に対する作用に、NO pathway が関与しているかを調べた。

上と同様に、延髄スライス標本からのユニット記録において L-NAME (NOS 阻害薬) の灌流前 5 分灌流中 5 分の自発活動数を比較した。NOS 阻害薬では背側縫線核内セロトニン神経の自発活動が低下しないため、サリドマイドの持つ NOS 阻害作用は、背側縫線核内神経細胞の自発活動低下に関与していないことが判明した。

## 【実験 6】新規サリドマイド受容体をラベルするためのサリドマイドの化学修飾

サリドマイドとポマリドミドのアミノ基に官能基を導入し、アフィニティークロマトグラフィーリガンドの合成を試みた。各化合物に 2 種類の官能基を導入し、その生理活性を元のサリドマイドやポマリドミドと比較した。いずれの化学修飾もセロトニン神経の自発活動抑制活性を喪失させてしまった。結果、元の薬理活性を保持させたかが  $\text{K}_\alpha$  修飾法を発見するに至らなかった。

## 【まとめ】

以上のことより、サリドマイドにはセロトニ

ン神経細胞発火抑制活性がある。しかし、その活性は、サリドマイドが結合する分子として唯一知られるセレブロン以外の受容体を介していることが示唆された。

〔雑誌論文〕(計0件)  
特記すべきもの無し

〔学会発表〕(計0件)  
特記すべきもの無し

〔図書〕(計0件)  
特記すべきもの無し

〔産業財産権〕  
特記すべきもの無し

出願状況(計0件)

特許性の高い萌芽的発明につながるため、情報公開は極力、回避してきた。

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等；該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

那波 宏之 (NAWA, Hiroyuki)  
新潟大学・脳研究所・教授  
研究者番号：50183083

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

難波 寿明 (NAMBA, Hisaaki)  
新潟大学・脳研究所・助教  
研究者番号：90332650

### (4) 研究協力者

斎藤 麻美 (SAITO, Mami)  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科