

# 博士論文

GPCR 標的治療薬に対する評価系の構築と  
薬効の発現機構に関する研究

佐久間 健介

## 目次

1. 序論 .....	4
2. GPCR を標的とする統合失調症治療薬に対する新しい評価系の構築 .....	6
2.1 実験材料と方法 .....	6
2.2 実験結果 .....	8
3. GPR40 作動薬ファシグリファミの血糖値依存的な薬効発現機構の解明 .....	11
3.1 実験材料と方法 .....	11
3.2 実験結果 .....	13
4. 考察 .....	16
5. 図表 .....	25
6. 総括 .....	47
7. 論文目録 .....	48
8. 引用文献 .....	49
9. 謝辞 .....	62

## 略語表

AUC	area under the curve
Ccn1	CCN family member 1
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DAG	diacylglycerol
ER	endoplasmic reticulum
FFT	Fast Fourier Transform
FFAR1	Free fatty acid receptor 1
GLUT	glucose transporter
GPCR	G-protein coupled receptor
HBSS	1x Hank's Balanced Salt Solution
IEG	immediate early gene
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-triphosphate
K <sub>ATP</sub> channel	ATP-sensitive potassium channel
KRBH	Krebs-Ringer-bicarbonate-HEPES
MAP	methamphetamine
NMDA	N-methyl-D-aspartate
PCP	phencyclidine
PKC	protein kinase C
PKD	protein kinase D
PSD	power spectrum density
SGLT-2	sodium/glucose cotransporter-2
Sgk1	serum/glucocorticoid-induced protein kinase 1
TFP	transcriptome fingerprint
TRPM5	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5
5-HT2	5-HydroxyTryptamine 2

## 1. 序論

Gタンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor; GPCR) は様々な疾患領域における重要な薬剤標的クラスの1つであり、上市薬のおよそ30%がGPCRをターゲットとしている (Fang et al., 2015; Rask-Andersen et al., 2011)。本研究ではGPCR標的治療薬に対する評価系の構築と薬効の発現機構についての研究を行った。

中枢疾患領域でGPCRが重要な治療標的とされてきた疾患の一つに統合失調症がある (Keshavan et al., 2016; Komatsu, 2015)。統合失調症に対する創薬はGai/o共役型GPCRであるドパミンD2受容体(D2R)の遮断作用を持つクロルプロマジンの発見に始まり、ドパミンシグナルの過剰な伝達が病態形成に深く関与するというドパミン仮説の出発点となった。こうして作られた初期のD2R遮断タイプの薬剤は定型抗統合失調症薬と呼ばれ、統合失調症の代表的な3症状(陽性症状・陰性症状・認知機能障害)のうち陽性症状に著効する。その後、D2受容体遮断に加えセロトニン2(5-HT<sub>2</sub>)受容体阻害作用を持つことで陰性症状の改善を狙ったセロトニン・ドパミンアンタゴニストや更に他の神経伝達物質受容体への親和性を持たせたMulti-Acting Receptor Target Antipsychotics (MARTA)、D2受容体に対して部分作動薬として働き陽性・陰性両症状に有効で副作用の少ないDopamine System Stabilizer (DSS)など様々な薬剤が創製され、非定型抗統合失調症薬と総称されてきた。しかしそれらの有効性を特定のシグナル活性をもとに比較して評価するのは難しくこの分野の課題とされてきた。本研究では、GPCR標的治療薬に対する新しい評価系としてシグナル伝達の下流で神経可塑性や認知機能の変化につながる最も初期の応答を起こす遺伝子群、最初期遺伝子群(immediate early genes: IEGs)に着目した。IEGsは外界からの刺激を受けて最も早い時間軸で一過性に応答する遺伝子群を指し、神経系においては神経可塑性や認知機能の変化に繋がるシグナル伝達のフィードバックや転写変化を起こす (Clayton, 2000; Okuno, 2011)。従って中枢神経系に作用する薬剤がもたらす可塑的な変化の初期応答として疾患と関連がある脳部位でのIEGsの発現変化を調べることは薬効のパターン分類や予測に繋がるだけでなくシグナル

伝達上のセカンドメッセンジャーやエフェクターとは異なる治療薬の評価系になる可能性がある。そのような評価系を確立できれば GPCR 標的治療薬に限らない様々な標的クラスの薬剤を包括的に評価することも可能かもしれない。

このような考え方を実証した先行研究の例として González-Maeso らによる幻覚剤の研究がある (Gonzalez-Maeso et al., 2007; Gonzalez-Maeso et al., 2003)。彼らは 5-HT<sub>2A</sub> 受容体作動薬に幻覚作用を持つ薬剤群と持たない薬剤群があることに着目しその差異を下流で転写調節される IEGs の発現調節パターンの違いに見出した。そこで私は統合失調症の薬剤群についても同様のアプローチが可能ではないかと考え、可塑的変化の早期評価系となるような IEG マーカの探索あるいは治療薬や特定の薬効に望ましい転写調節プロファイルの同定を試みた。すなわち、既存の抗統合失調症薬や薬剤モデルに使われる精神刺激薬をマウスに投与した時に、疾患と関連性の高い脳の各部位で IEGs がどのような変動パターンを示すか解析を行った。

他方、武田薬品工業で創製されたファシグリファミン (TAK-875) は、中鎖鎖脂肪酸をリガンドとする GPCR の GPR40 (FFAR1) に対するアゴニアロステリックモジュレーターである (Itoh et al., 2003; Negoro et al., 2010; Srivastava et al., 2014; Yabuki et al., 2013) (但し、本研究内においては本質的に変わらないので以下“作動薬”の括りとする)。GPR40 は膵臓の  $\beta$  細胞に高発現しその活性化によって G $\alpha_q$  シグナル経路下流の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇を介してインスリン分泌が促進されることから、既存のインスリン分泌促進薬とは異なる新しい抗糖尿病薬メカニズムとして注目されてきた。2 型糖尿病の治療薬としてはこれまでにスルホニル尿素 (Sulfonylurea: SU 剤)、メトホルミンに代表されるビグアニド類、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤、グリタゾン系、ジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4) 阻害剤、GLP-1 アナログ、近年上市されたナトリウム・グルコース共役輸送体 2 (sodium/glucose cotransporter-2: SGLT-2) 阻害剤等が上市・処方されている (AmericanDiabetesAssociation, 2016)。SU 剤は生活習慣改善療法及びメトホルミン治療に続く介入の第一選択としてよく処方される薬剤であるが重篤な副作用となり得る低血糖リスクを持つ。DPP-4 阻害剤や GLP-1

アナログは同リスクを持たないが多くの患者さんにおいて十分な血糖コントロールが出来ているとは言い難い。心血管リスクの減少作用等これまでに無いベネフィットを持つ新規な SGLT-2 阻害剤 (Fitchett et al., 2016; Zinman et al., 2015) にも、低血糖・尿路感染・脱水・ケトアシドーシス等の副作用が存在する。従って低血糖リスクが無く強い血糖低下作用を持つ新規薬剤に対する医療現場の期待は依然として高かった。

GPR40 作動薬の新規抗糖尿病薬としての最大の魅力は、血糖値に依存したインスリン分泌促進作用であり、これは上述した既存薬の副作用である低血糖リスクの回避に繋がる。実際に臨床第 3 相試験までの結果で、ファシグリファム投与群は既存薬である SU 剤と同等以上の血糖低下作用を示す一方で、SU 剤に高い低血糖の発現率はプラセボ群と同等という成績が得られ、このメカニズムのヒトでの有効性を証明した薬剤となった (Burant et al., 2012; Kaku et al., 2015)。このような特性を持つファシグリファムであるが、そのインスリン分泌促進作用のグルコース濃度依存性のメカニズムについては、臨床後期に至るまで未だ完全な理解がなされていなかった。そこで本研究では、グルコース依存性インスリン分泌 (glucose-stimulated insulin secretion: GSIS) に対する GPR40/Gαq 下流シグナルのクロストークや役割を調べ、ファシグリファムの示すユニークな薬効の発現機構について検討を行った。

## 2. GPCR を標的とする統合失調症治療薬に対する新しい評価系の構築

### 2.1 実験材料と方法

#### 2.1.1 動物

実験に用いた正常マウスはクレアジャパンから購入した ICR マウスあるいは C57BL6/J マウスを用いた。それらマウスは自由給水・自由給餌・12 時間毎の明暗サイクル (明期: 午前 7 時より午後 7 時まで) が確保された飼育条件で維持され、薬剤投与実験前には前もって適切な実験室環境への馴化を行った。全ての実験は武

田薬品工業株式会社動物実験委員会の承認を得て行われた。

### 2.1.2 遺伝子発現変動実験

薬剤投与は各実験ごとに示す投与経路（経口，静脈内，皮下）で投与され、それぞれのタイムポイントで回収した全脳からプレジジョンブレインスライサー（Braintree Scientific）を用いて氷上で前頭前野、側坐核、線条体、海馬を切り出した。対照群として 0.5% メチルセルロース水溶液投与群（経口）あるいは 0.9% 生理食塩水投与群（静脈内，皮下）をそれぞれ設けた。[図 1](#) に示す模式図のように前頭前野は嗅球から 1 mm 後ろ側の前頭葉の前部の 1 mm スライスを指し、同様に側坐核、線条体、海馬はそれぞれ解剖学的に識別し左右脳から切り出した 1 mm のスライスを用いた。それら脳部位から Isogen（ニッポンジーン）を用いて RNA 抽出を行い DNase I Amp Grade 処理した後、逆転写反応をランダムプライマーと SuperScript II 逆転写酵素（いずれもサーモフィッシャー）を用いて行った。得られた cDNA を用いリアルタイム PCR 7900HT 機（サーモフィッシャー）にて定量 PCR 反応を行った。増幅サイクルは 50°C 2 分→95°C 10 分→（95°C 15 秒+ 60°C 1 分）x40 cycle で測定を行いスタンダードオリゴ配列と未知検体の Ct 値を比較することで絶対コピー値を算出した。異なるサンプル間の比較を行うためハウスキーピング遺伝子 *cyclophilin A* の発現コピー数で補正して各サンプルにおける相対発現値を比較した。用いたマウス TaqMan プライマープローブ，オリゴテンプレートの配列は [表 1](#) に示した。

### 2.1.3 統計学的処理

得られたデータの統計学的処理については González-Maeso らの先行研究 (Gonzalez-Maeso et al., 2003) を参考とした。用量依存性試験においてはまず、Bartlett 検定（有意水準 5 %）により分散の均一性を検定し均一と判定された場合 Williams 検定、均一でない場合 Shirley-Williams 検定（有意水準片側 2.5 %）を行った。タイムコース試験においては Welch の t 検定によってそれぞれのタイムポイントで対照

群に対する有意性を有意水準 5 % で検討した。

## 2.2 実験結果

### 2.2.1 定型・非定型統合失調症薬の急性投与は側坐核、線条体を中心に一過性の IEGs の発現上昇をもたらす

第1世代～第3世代の治療薬を代表する、定型抗統合失調症薬のハロペリドール、非定型抗統合失調症薬のオランザピン、アリピプラゾール、クロザピンはそれぞれ様々な GPCR に対する阻害活性を持ちその薬理学的特性が異なる (図2)。まず初めにこれら薬剤を投与した際のマウス脳における IEGs の発現変動タイムコースを検討した。本検討における薬剤の投与量と経路についてはマウスの行動アッセイ系で有効な作用が出ている既報 (Boulay et al., 2010; Ma et al., 2013) の投与量と経路を参考例としてハロペリドールは 0.3 mg/kg、オランザピン 10 mg/kg、アリピプラゾール 3 mg/kg、クロザピン 30 mg/kg のいずれも経口投与とした。検討部位には統合失調症の病態形成において重要な役割を持つ4部位、作業記憶形成に関与する前頭前野、腹側被蓋野から投射を受け情動行動を司る側坐核、黒質から投射を受け運動機能調節に重要な役割を果たす線条体、前頭前野と同じく認知機能や記憶を司る海馬、を選択した (図1)。統合失調症との高い関連性が期待される IEGs として、最も有名な IEG であり神経活動マーカーとして広く用いられている *c-fos* (Greenberg and Ziff, 1984; Morgan et al., 1987)、アクチンと結合しシナプスの活動性を調節することで長期記憶の形成に関わることが知られ (Lyford et al., 1995; Okuno et al., 2012) 統合失調症患者の前頭前野における発現低下 (Guillozet-Bongaarts et al., 2014) や遺伝子欠損マウスの統合失調症様諸症状発症 (Manago et al., 2016) が報告された *Arc*、同様に患者の死後脳解析で発現低下が認められ統合失調症の脆弱性因子と考えられた EGR ファミリーの *Egr1*, *Egr2*, *Egr3* (Yamada et al., 2007)、クロザピン投与による発現変動が報告される *Sgk1* (serum/glucocorticoid-induced protein kinase-1) (Robbins et

al., 2008)、そして精神刺激薬による発現誘導が知られる *Ccn1* (CCN family member 1) (Ito et al., 2007) の7つに着目した。

4 薬剤を投与後 4 時間後までのサンプル (30 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間) を採集し IEG mRNAs の発現レベルを測定した。その結果、いずれの薬剤投与群においても投与後 1~2 時間に一過性発現上昇のピークが存在し 4 時間にかけて収束することが判った (図 3)。ハロペリドール、アリピプラゾールの 2 剤は特に類似性の高い発現パターンを示し、側坐核と線条体で *c-fos*, *Arc*, *Egr2* の発現上昇をもたらした。同様にオランザピンも側坐核における *c-fos*, *Egr2*、線条体における *c-fos*, *Arc*, *Egr1*, *Egr2*、海馬での *Ccn1* の発現上昇を示した。一方クロザピンの作用はそれら 3 剤とは大きく異なり検討した 4 つの部位の殆どで *c-fos*, *Sgk1*, *Ccn1* を誘導した。すなわち他の既存薬とは異なる転写調節メカニズムで薬効をもたらす可能性を示唆した。

続いてそれら既存治療薬 4 薬剤による IEGs 発現変動の用量依存性試験を行った。図 3 に示したタイムコース実験の結果からそれぞれの薬剤で最大の転写変化がみられる時点をハロペリドール、オランザピン、クロザピンの 3 剤については投与後 60 分、アリピプラゾールのみ 120 分とした。経口投与の投与量をハロペリドール 0.03~1 mg/kg、アリピプラゾール 0.1~3 mg/kg、オランザピン 0.3~10 mg/kg、クロザピン 1~30 mg/kg として発現変動実験を行ったところ、図 4 に示すようにそれぞれ順に 0.3, 0.3, 1, 30 mg/kg で顕著な mRNA の発現変動を示した。用量依存性について、ハロペリドール、アリピプラゾール、オランザピンの 3 剤はタイムコース試験同様、側坐核と線条体で類似性の高い変動パターンを示し特に *c-fos*, *Arc*, *Egr2* の発現上昇を特徴とした。クロザピンの発現パターンはやはり 3 剤とは大きく異なるものであった。

### 2.2.2 ドパミン D2 受容体作動薬と遮断薬による IEGs 発現変動の比較考察

類似性の高い発現パターンを示した 3 剤はいずれもドパミン D2 受容体 (D2R) への高い結合活性で知られることから、D2R 作動薬及び遮断薬を投与した際の IEGs 発現パターンを調べて比較した。薬剤の投与量と経路についてはマウスの行動アッ

セイ系で有効な作用が出ている既報の投与量と経路を参考 (Zarrindast et al., 2008; Zarrindast and Rezayof, 2004) として D2R 作動薬のキンピロールは 10 mg/kg、遮断薬のスルピリドは 100 mg/kg のいずれも静脈内投与とした。すると [図 5a](#) に示すように、D2R 遮断薬のスルピリドは側坐核及び線条体で主に *c-fos*, *Arc*, *Egr2* を 60 分までに発現誘導し先に見た共通性の高い既存薬 3 剤と近いパターンを示した。一方 D2R 作動薬のキンピロールは側坐核及び線条体では顕著な *c-fos*, *Arc*, *Egr1*, *Egr2* の発現低下をもたらし、他に 4 部位全てで *Sgk1* の発現上昇を、前頭前野と海馬で *Ccn1* の発現上昇を示した。側坐核及び線条体における変化はハロペリドール、アリピプラゾール、オランザピンの 3 剤及びスルピリドとは対照的なパターンであった。以上より *c-fos*, *Arc*, *Egr2* の発現誘導は D2R シグナル遮断作用を強く反映した変化である可能性が考えられた。

### 2.2.3 薬剤誘発モデル精神刺激薬 NMDA 受容体遮断薬及びメタンフェタミンによる IEGs の発現変動との比較

N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体はイオンチャネル型のグルタミン酸受容体であり、前頭葉でのグルタミン酸神経伝達の機能低下が統合失調症の一因であるというのがドパミン仮説に次いで広く信じられてきたグルタミン酸仮説である (Balu, 2016; Kantrowitz and Javitt, 2012)。実際、NMDA 受容体遮断薬はヒトで統合失調症の陽性症状だけでなく陰性症状様の症状を引き起こすことが知られてきた (Javitt and Zukin, 1991; Krystal et al., 1994)。陰性症状については既存薬が効果不十分であることから NMDA 受容体遮断薬は同症状にアプローチするための薬剤誘発モデルとして前臨床のげっ歯類を用いた検討でも広く用いられてきた。そこでこの NMDA 受容体遮断薬のフェンサイクリジン (phencyclidine: PCP) 10 mg/kg 及び MK-801 1 mg/kg (いずれも皮下投与) による IEGs 発現変動パターンのタイムコース試験を行った。その結果、NMDA 受容体遮断薬は D2R 作動薬と類似の側坐核及び線条体における *Arc*, *Egr2* の発現低下や 4 部位における *c-fos*, *Ccn1* の上昇をもたらした ([図 5b](#))。次

に用量依存性試験 (PCP 1~10 mg/kg、MK-801 0.1~3 mg/kg 皮下投与 60 分後サンプリング)を行ったところ側坐核及び線条体における *Egr2* の発現低下や線条体における *Arc* の発現低下、4 部位における *c-fos*, *Ccn1* の上昇がやはり認められた (図 6)。すなわち D2R シグナル遮断あるいは NMDA 受容体活性化による側坐核・線条体での *Arc*, *Egr2* の発現上昇は統合失調症への少なくとも一部の治療効果を期待させる可塑性の早期遺伝子マーカー候補になり得る可能性が考えられた。

他方、メタンフェタミン (methamphetamine: MAP) は脳内で神経終末からのドパミン過剰放出を引き起こし統合失調症の陽性症状様の症状をもたらす覚醒剤として知られており (Yui et al., 2000)、NMDA 受容体遮断薬と共に統合失調症の創薬研究に広く用いられてきた。そこで MAP 3 mg/kg 皮下投与による IEGs 発現変動パターンのタイムコース試験を行ったところ、4 つ全ての部位で一過性の *c-fos*, *Arc*, *Egr2*, *Ccn1* の上昇をもたらした (図 5b)。用量依存性試験 (1~10 mg/kg、皮下投与 60 分後サンプリング) でも同様の *c-fos*, *Arc*, *Egr2*, *Ccn1* の発現上昇が認められ (図 6)、強い中枢興奮作用を持つ間接型アドレナリン受容体刺激薬による脳内各部位での IEGs 発現上昇 (*c-fos*, *Arc*, *Egr2*, *Ccn1*) が明らかになった。

### 3. GPR40 作動薬ファシグリファムの血糖値依存的な薬効発現機構の解明

#### 3.1 実験材料と方法

##### 3.1.1 細胞株と試薬調製

マウス膵  $\beta$  細胞株 MIN6 は大阪大学・宮崎教授から提供されたもの (Miyazaki et al., 1990) を用い、DMEM 培地に 10% 非働化ウシ血清, 100 IU/mL ペニシリン, 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン及び 55  $\mu$ mol/L 2-メルカプトエタノール (いずれもサーモフィッシャーより購入) を添加した培養培地によって 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で維持した。

ファシグリファム (TAK-875) は武田薬品工業で合成されたものを用いた。

Krebs-Ringer-bicarbonate-HEPES (KRBH) 緩衝液は 116 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.17 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.17 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 25 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 2.52 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 24 mmol/L HEPES の組成で pH= 7.4 となるよう調製し 0.2% ウシ血清アルブミン (BSA) を加えたものを実験時に用時調製した。

### 3.1.2 インスリン分泌アッセイ

MIN6 細胞を 96 well プレートに  $6 \times 10^4$  cells/well で細胞播種し 2 日間培養した。アッセイ当日培地を捨てて 1 mmol/L グルコースと 0.2% BSA を含む KRBH バッファで 37°C, 1 時間プレインキュベーションした後、各種刺激剤や阻害剤を加えて 2 時間インキュベートした。上清を回収し含有インスリン濃度を AlphaLISA インスリンアッセイキット (パーキンエルマー) で測定した。

### 3.1.3 Ca<sup>2+</sup>イメージングアッセイ

MIN6 細胞を 8 well Nunc Lab-Tek チャンバースライドに  $1.5 \times 10^5$  cells/well で播種し 3~5 日間培養した。培養培地を除いた後、細胞に 5  $\mu$ mol/L Fura-2 AM を含む HBSS/HEPES バッファ (20 mmol/L HEPES と実験ごとのグルコース濃度を添加) を加え 37°C, 45 分プレインキュベーションを行った。HBSS/HEPES バッファで 3 回洗浄し再び HBSS/HEPES バッファを加えてニコン倒立顕微鏡 Eclipse Ti に乗せ併設の Aquacosmos レシオイメージングシステム (浜松ホトニクス) で 5 分間のイメージングを行った。撮像開始後 2.5 分時にリガンド添加し 0.5 秒間隔で 340 nm 励起の蛍光強度と 380 nm 励起の蛍光強度比 (340/380 nm) を付属ソフトウェアにて算出・記録した (蛍光波長 : 535 nm)。細胞内カルシウムレベルの変化は刺激前後 1 分間の AUC (area under the curve) 比で求めた。スペクトル解析は高速フーリエ変換 (Fast Fourier Transform: FFT) で波の周波数成分を取り出し、得られた周波数成分の 2 乗をタイムポイント数 (N= 128) で規格化することでパワースペクトル密度 (PSD) を求めた。これらの解析手法は Uhlen の先行研究 (Uhlen, 2004) を参考に行った。

### 3.1.4 統計学的処理

作用増強の有意性は Welch の t 検定もしくは Dunnett の多重比較によって検定した（有意水準 5%）。要因同士の相乗作用の検定には二元配置分散分析を行い交互作用の有無を有意水準 5% で求めた。濃度依存性の検定には Bartlett 検定（有意水準 5%）により分散の均一性を検定し均一と判定された場合 Williams 検定、均一でない場合 Shirley-Williams 検定（有意水準片側 2.5%）を行った。全ての統計学的解析は SAS Institute の Statistical Analysis System version 9.3 を用いて行った。

## 3.2 実験結果

### 3.2.1 GPR40 作動薬ファシグリファムは脱分極下でのみインスリン分泌促進作用を発揮する

膵β細胞におけるいわゆるグルコース応答性インスリン分泌は、細胞内に取り込まれた血中グルコースが代謝を受け ATP/AMP 比が上昇、ATP 感受性カリウムチャンネル ( $K_{ATP}$  channel) が閉じて細胞膜の脱分極を生じ、電位依存性カルシウムチャンネルが開口して細胞外からカルシウムが流入し、インスリン分泌顆粒の放出が促進される、という一連の機構で生じる (Rorsman and Braun, 2013)。そこでまず、ファシグリファムのインスリン分泌促進作用発揮における細胞膜の脱分極の必要性を検討した。高グルコース条件下 (16 mmol/L) で発揮されるファシグリファム (1  $\mu$ mol/L) のインスリン分泌促進作用は、ATP 感受性カリウムチャンネルの開口薬であるジアゾキシド (100  $\mu$ mol/L)、L 型電位依存性カルシウムチャンネルの阻害剤であるニフェジピン (10  $\mu$ mol/L) によって殆ど消失した (図 7a, 図 11a)。すなわち膜の脱分極がファシグリファムの作用発揮に必須と考えられた。逆にグルコース非存在下ではインスリン分泌は殆どなく、ファシグリファムも作用を示さないが、古典的な脱分極剤として広く知られる塩化カリウム刺激 (10 mmol/L) によってインスリン分泌が引き起こされ、この時ファシグリファムのインスリン分泌促進作用が発揮された (図 7b)。

これらの結果から、グルコースの代謝等で生じる細胞膜の脱分極がファシグリファムの作用発揮に必要であると考えられた。

### 3.2.2 GPR40 下流の $IP_3/Ca^{2+}$ , DAG/PKC 経路のそれぞれがインスリン分泌促進作用に寄与する

次に、GPR40/Gαq 下流のセカンドメッセンジャーである  $IP_3$  と DAG の膜透過性アナログを用いて、ファシグリファムのインスリン分泌促進作用における両経路の寄与について検討した。既報によりファシグリファムは内在性の中鎖鎖脂肪酸と相乗的にグルコース依存性インスリン分泌作用を増強すること、また  $IP_3$  の産生量にはグルコース濃度依存性は無いことを報告している (Tsujiyata et al., 2011; Yabuki et al., 2013)。そこで異なるグルコース濃度における  $IP_3$  と DAG の作用様式について検討した。すると  $IP_3$  と DAG、いずれの膜透過性アナログ (10  $\mu\text{mol/L}$ ) を添加した場合においてもファシグリファムの場合同様、グルコース濃度依存的なインスリン分泌作用の増強がみられたことから (図 8)、 $IP_3/Ca^{2+}$ , DAG/PKC 経路のいずれもがインスリン分泌促進作用に寄与すると考えられた。

### 3.2.3 ファシグリファムはグルコース濃度依存的にカルシウムオシレーションの振幅を周波数に依らず上昇させる

膵  $\beta$  細胞におけるインスリン分泌には周期性があることが知られており、細胞質におけるカルシウムオシレーションがその周期性に重要と言われている (Bergsten, 1995; MacDonald and Rorsman, 2006)。カルシウムオシレーションは効率的な転写活性化やミトコンドリアを始めとする他の細胞内小器官への波及を通じた代謝活性化をもたらすといった生理的意義を持つ (Berridge, 1997; Gilon et al., 2014; Smedler and Uhlen, 2014)。そこでファシグリファムの刺激がカルシウムオシレーションにどのような影響を与えるか検討した。細胞内カルシウム指示薬 Fura2-AM を用いて各グルコース濃度 (0, 1, 3, 10, 16 mmol/L) におけるカルシウムオシレーションをレシオメ

トリックに検出し、ファシグリファム刺激 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) を加える前後の波形を比較した。得られた波形に対して高速フーリエ変換を行って振幅および周波数特性を調べた。すると、特定の周波数成分にのみ影響を及ぼすということにはなかったが、全ての周波数帯で振幅の2乗に比例するパワースペクトル密度をグルコース濃度依存的に上昇させることが判明した (図 9a-c)。なお、SU 剤のグリメピリド ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) はインスリン分泌同様、グルコース濃度と無関係にカルシウムオシレーションを惹起し、ファシグリファムとは制御様式が異なっていた (図 9d-f)。

### 3.2.4 GPR40 下流の $\text{IP}_3$ 受容体刺激はグルコース濃度に応じてカルシウムオシレーションを増強し DAG 刺激による PKC 活性化は殆ど影響を与えない

続いてファシグリファム刺激による GPR40 活性化の下流シグナル入力について膜透過性  $\text{IP}_3$  刺激と DAG によるカルシウムオシレーションへの影響を調べた。膜透過性  $\text{IP}_3$  刺激 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) はファシグリファム同様、カルシウムオシレーションをグルコース濃度依存的に増強した一方、DAG 刺激 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) はカルシウムオシレーションには殆ど影響を与えなかった (図 10)。よって  $\text{IP}_3$  受容体の活性化を介した小胞体からのカルシウム放出は、細胞質におけるカルシウムオシレーションの増強を介してインスリン分泌促進作用をもたらすと考えられたが、DAG/PKC 経路はカルシウムオシレーションの制御とはまた別の機序でインスリン分泌促進に寄与していると考えられた。

### 3.2.5 DAG/PKC 経路は L 型電位依存性カルシウムチャネルを通じた細胞外からのカルシウム流入と相乗的にインスリン分泌を促進する

そこで DAG/PKC 経路活性化のインスリン分泌増強への寄与に関して明らかにする目的で、更にカルシウムダイナミクスとの相互作用について調べた。グルコース非存在下において膜透過性 DAG 刺激 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) による PKC 活性化は濃度依存

的な若干のインスリン分泌促進作用を示した。ここに L 型電位依存性カルシウムチャネルの開口薬である Bay K 8644 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) を共存させ、細胞外からのカルシウム流入を起こしたところ相乗的にインスリン分泌を引き起こすことがわかった (図 11b.c)。よって DAG による PKC 活性化はおそらく下流の分泌顆粒や細胞骨格への作用によってカルシウムダイナミクスと独立かつ相乗的にインスリン分泌促進に寄与しているのではないかと考えられた。

## 4. 考察

### 4.1 GPCR を標的とする統合失調症治療薬に対する IEGs に着目した新しい評価系の構築について

#### 4.1.1 既存薬 3 剤が示した IEG 発現誘導プロファイルの共通性に関する考察

本検討では GPCR を標的とする統合失調症治療薬に対する新しい評価系として、シグナル伝達の下流で神経可塑性や認知機能の変化につながる最も初期の応答を起こす IEGs に着目した解析を行った。すなわち、統合失調症の既存薬 (図 2) や薬剤モデルに用いられる精神刺激薬をマウス脳に投与した際に、疾患と関連性の深い 4 つの脳部位で (図 1)、7 つの IEGs がどのような発現パターンを示すかプロファイリングを実施した。

その結果まず、臨床で統合失調症の陽性症状に効果があるとされているハロペリドール、オランザピン、アリピプラゾールの 3 剤が側坐核と線条体で *c-fos*, *Arc*, *Egr2* の一過的な発現上昇を引き起こすという共通性を示した (図 3, 図 4)。特にハロペリドールとアリピプラゾールのプロファイルは非常に類似性の高いものであった。序論で述べた通り、第 2 世代, 第 3 世代に分類される非定型抗統合失調症薬あるいは DSS のオランザピンとアリピプラゾールについては陰性症状にも効果があるとされておりハロペリドールには無い更なる特徴を見出すことを期待したが、今回の検討ではそのような特徴はみられなかった。他の IEG や脳部位を調べることで差

異が見出せる可能性の外、2009年にLancet誌に報告されたLeuchtらのメタ解析結果によれば実はそれら薬剤の陽性・陰性症状に対する効果は目立った違いがないとする説もあり (Leucht et al., 2009)、そもそも差を見出すことが難しい可能性も考えられる。

側坐核及び線条体はそれぞれ腹側被蓋野及び黒質緻密部からドパミン神経の投射を受けており、D1及びD2ドパミン受容体(D1R, D2R)が高発現する (Ikemoto, 2007)。これら部位での既存薬による後シナプスD2R遮断が、陽性症状改善と副作用の錐体外路症状をもたらしてきた。従って3剤による*c-fos*, *Arc*, *Egr2*の発現誘導はD2R遮断を介した転写活性化であると推定され、これを裏付けるように比較的選択性の高いD2R遮断薬として知られるスルピリドはやはり同様の*c-fos*, *Arc*, *Egr2*発現上昇を示し、D2R作動薬として知られるキンピロールは反対に発現低下を示した (図5a)。また3剤による*c-fos*, *Arc*, *Egr2*の発現変動はおしなべて側坐核よりも線条体で強い傾向にあり (図3, 図4)、これはD2Rの発現レベルが前者の方が高い (Komatsu et al., 2014) のを反映した結果と言えるかもしれない。

#### 4.1.2 IEG 発現誘導プロファイルから見たドパミン仮説とグルタミン酸仮説の 交わり

そして興味深いことにキンピロールが示したプロファイルは2つのNMDA受容体遮断薬(PCP, MK-801)が示したそれと似通っており (図5)、D2R活性化でNMDA電流が抑制されるという過去の知見 (Beazely et al., 2006; Flores-Hernandez et al., 2002) からD2R遮断薬は脳基底核のNMDAシグナル賦活を介して*c-fos*, *Arc*, *Egr2*の発現上昇をもたらす可能性が考えられた。D2Rに部分作動薬活性を持つアリピプラゾールは、細胞外のドパミン量が過剰な状態では後シナプス受容体に対してアンタゴニスト様に振舞うことが想定される (Hirose and Kikuchi, 2005)。統合失調症発症の背景にあるNMDAシグナル低下とドパミンシグナルの過剰伝達はおそらく複雑な相互制御のもとで成り立っていると考えられ、必ずしも単純な拮抗関係

が見られるとは限らないかもしれない (Laruelle et al., 2005)。しかしながら NMDA 受容体遮断薬による側坐核や線条体での *Arc*, *Egr1*, *Egr2* の低下に対して既存薬 3 剤が拮抗的に働くか、今後、共投与実験のデータを得て議論したい。

#### 4.1.3 クロザピンとメタンフェタミンの発現プロファイルに関する考察

クロザピンは陽性・陰性症状両方に有効であるが顆粒球減少等の重篤な副作用があるため、厳密な管理の下での治療抵抗性統合失調症に対する処方に限られる。クロザピンは D2R に対する親和性が弱く他の様々な受容体に対する結合活性を持ち "magic shotgun" と呼び習わされてきた薬剤である (Roth et al., 2004)。クロザピン投与は今回検討した4部位の殆ど全てで *c-fos*, *Sgk1*, *Ccn1* の発現誘導を示すという他の薬剤とは全く異なるプロファイルを示した (図 3, 図 4)。選択的な 5-HT<sub>2</sub> 受容体遮断薬、ムスカリン受容体遮断薬、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体遮断薬等のデータが無いためここではこれ以上の考察が出来ないが、独特の薬効と副作用を持つクロザピンが示す転写調節はやはり他の既存薬とは異なるものであることが明らかとなった。

メタンフェタミン (MAP) は前述の通り、統合失調症の陽性症状様の作用を引き起こす覚醒剤であるが本検討では4部位のほぼ全てで *c-fos*, *Arc*, *Egr1*, *Egr2*, *Ccn1* の発現誘導を示した (図 5b, 図 6)。大脳基底核における TFP については既存薬 3 剤 (ハロペリドール、アリピプラゾール、オランザピン) と同様のプロファイルであるが、既報から MAP による *c-fos*, *Arc*, *Egr1*, *Egr2* の誘導については黒質網様部へ投射する D1R 陽性の中型有棘神経 (いわゆる直接路) への興奮性入力によるものであるのに対して、既存薬によるそれらは淡蒼球外節へと投射する D2R 陽性中型有棘神経 (間接路) に対する脱抑制を表したものと考えられる (Bertran-Gonzalez et al., 2008)。また MAP は実は低用量では統合失調症の認知機能低下を改善方向になびかせ、高用量での過度の覚醒作用が著しい認知機能悪化をもたらすという “逆 U 字型効果” を持つことが知られている (Wood et al., 2014)。慢性使用による神経毒性や著しい認知障害、重篤な依存性、幻覚や妄想といった中枢性作用、血圧上昇や急性心不全等の

末梢への悪影響をここで論じるまでもないが (Panenka et al., 2013)、低用量による一定の生理的範囲内の転写調節があり、それを超越した場合に高用量で見られたようなロバストな発現誘導が起こり心身の破壊に繋がるものと考えられる。

#### 4.1.4 IEGs に着目した統合失調症治療薬の新しい評価系の構築についての小括

本研究で既存の統合失調症薬や薬剤モデルに用いられる精神刺激薬は、それぞれの特徴的な薬効を反映するような時空間的な IEGs 発現誘導プロファイルを示すことが分かった。すなわち、IEGs は統合失調症の発症や症状改善に繋がる可塑的変化の早期マーカーとして有用であると考えられた。

半世紀以上にわたる創薬の試みと、それによって得られた膨大な病態生理学及び疫学的な知見の蓄積にも関わらず、未だ処方されている統合失調症治療薬はドパミン神経伝達遮断とその周辺メカニズムを標的としたものに過ぎない。進捗は微々たるものと言わざるを得ず、未だ陰性症状や認知機能の十分な改善には至っていない (Keshavan et al., 2016)。これは既存薬を基準にした漸進的な創薬研究手法や、成功を収めた薬剤もクロルプロマジンやクロザピンのようにセレンディピティー的に得られたもの、あるいはアリピプラゾールのように *in vivo* スクリーニングで見出して後から理論を得た薬剤であることが根底にあると考えられる。この点に関しては、今回行った *in vivo* スクリーニング的な評価系構築の試みも D2R 遮断、NMDA シグナル賦活を介した大脳基底核での *c-fos*, *Arc*, *Egr2* の発現誘導がおそらく陽性症状改善に繋がる可能性を示したに過ぎず、陰性症状や認知機能改善を期待させるマーカーを見出すには至っていない。現在それらの改善が期待される 5-HT<sub>1A</sub> 受容体作動薬、 $\alpha$ 7 ニコチン受容体作動薬や 5-HT<sub>6</sub> 受容体遮断薬などのプロファイルを得て更に重ね合わせることでマーカーとなるような遺伝子のサブセットやシグナル経路が新たに見出されるかもしれない。

## 4.2 GPR40 作動薬ファシグリファムの薬効発現機構について

### 4.2.1 Gαq シグナルによるインスリン分泌促進作用とファシグリファム

膵β細胞は様々な膜表面受容体や膜輸送タンパク質、酵素や核内受容体を始めとする細胞内システムを備えておりそれらを用いて栄養シグナルを代謝・変換し適切なインスリン分泌応答へと繋げる (Gilon et al., 2014; Rorsman and Braun, 2013)。グルコースの場合はグルコーストランスポーター (glucose transporter: GLUT) を介した細胞内への取り込み後ミトコンドリアで代謝を受け、産生された ATP による ATP/ADP 比の上昇を感知して ATP 感受性カリウムチャンネルが閉じ、細胞膜の脱分極が起こる。これにより電位依存性の L 型カルシウムチャンネルが開き、細胞外からのカルシウムイオンの流入が起こりインスリン分泌へと繋がっていく。他方、Gαq シグナルがこのグルコース依存性インスリン分泌を増強することはノックアウトマウスの解析等により良く知られており (Fujiwara et al., 2005; Gilon and Henquin, 2001)、薬剤による Gαq 共役型 GPCR 活性化で同作用が実現することについては膵β細胞に高発現するムスカリン M3 受容体や GPR40 が標的候補とされていた。経口投与可能な選択的 GPR40 作動薬ファシグリファム (TAK-875) (Negoro et al., 2010; Negoro et al., 2012) は、後にシグナルアッセイや X 線結晶構造解析の結果から部分作動薬活性を持ち、内在性リガンドの脂肪酸とはやや異なる位置に結合するアゴーステリックモジュレーターであることが明らかになった化合物 (Srivastava et al., 2014; Yabuki et al., 2013) であるが、この化合物の最大の差別化点であり前臨床及び臨床試験において実証された低血糖リスクの少ないグルコース濃度依存的なインスリン分泌作用の作用機序については、不明な点が残っていた。

### 4.2.2 脱分極発生下でのみインスリン分泌作用が発揮されることの意義

本研究でまず私はグルコースの代謝等で起こる細胞膜の脱分極がファシグリファムのインスリン分泌促進作用発揮に必要な十分であることを初めて明らかにした (図 7)。強制的な脱分極誘導下においてはグルコース非存在下であっても、ファシグリ

ファムはインスリン分泌促進作用を示した。SU 剤存在下では GW9508 (GPR40, 120 作動薬) がインスリン分泌作用を示すという Yang らの報告 (Yang et al., 2010) は、これに類似した先行研究である。彼らも論じているように SU 剤はグルコース代謝で起こる脱分極イベントを起こす (あるいは模倣する) 薬剤刺激に外ならず、作用機序上、過剰なインスリン分泌促進による低血糖リスクを免れ得ない。膜電位に関する電気生理学的検討等の詳細なエビデンスが必要ではあるが、ファシグリファム等による GPR40 活性化で動員される小胞体からのカルシウムダイナミクスは脱分極以降のインスリン分泌メカニズムを増強するものの、単独で強い脱分極を起こすような刺激とならないことがグルコース濃度に対する従属性をもたらしているのではないかと推定される。なお SU 剤との比較についてもう 1 点付け加えると、SU 剤は服用開始時は著効していたが次第に効力を失い良好な血糖コントロールが出来なくなる、いわゆる 2 次無効と呼ばれる効果減弱現象が一定の割合で起こることが知られている。しかしながらファシグリファムは、げっ歯類で確立された 2 次無効モデルでも有効であり単剤として SU 剤に優れる可能性が Ito らにより示唆されている (Ito et al., 2016)。

#### 4.2.3 ファシグリファムによるグルコース濃度依存的なカルシウムオシレーションの振幅増強の意義

振幅と周波数はパルス状のインスリン分泌に繋がる膵  $\beta$  細胞のカルシウムオシレーションにおける 2 つの重要な構成パラメータである (Smedler and Uhlen, 2014)。周波数に関して膵  $\beta$  細胞ではこれまでに様々な知見が得られてきた。機能面では低周波帯が主に解糖系の活性等の代謝機能と、高周波帯はカルシウムがトリガーとなって引き起こされるエキソサイトーシスに必要なイオンチャネル活性と共役すると言われ (Bergsten, 2002; Liu et al., 1998)、またタンパク質による制御との関連性については TRPM5 (Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5) や電位依存性の L 型カルシウムチャネルの  $\beta 3$  サブユニットが各々特定の周波数帯の波

と共役しているといった報告がなされてきた (Berggren et al., 2004; Colsooul et al., 2010)。そこで本研究では続いて、ファシグリファミン及び下流 Gαq シグナルによるカルシウムオシレーションの制御を明らかにする目的でイメージング実験を行った。その結果、ファシグリファミンが特定の周波数帯の波を制御する、あるいはそこから TRPM5 や β3 サブユニットのような具体的下流因子との連関が明らかになるということは無かったが、全ての周波数帯において等しく振幅を増強するということが判った (図 9a-c)。振幅が増強されることはおそらく高いインスリン分泌効率や様々な細胞内小器官のカルシウムホメオスタシスへの波及効果をもたらす生理的意義があると思われる。例えばミトコンドリアは小胞体と密な情報伝達を行うが、クエン酸回路や ATP 合成関連の酵素にはカルシウム結合サイトを持つものが多く存在する (Alam et al., 2012; Gilon et al., 2014)。従ってファシグリファミンによる細胞質でのカルシウムオシレーションの振幅増強がミトコンドリアのグルコース代謝や ATP 合成を促進し長期的にインスリン分泌作用を大きくする可能性は十分に考えられる。

カルシウムオシレーションの制御について SU 剤のグリメピリドはファシグリファミンとは対照的にやはりグルコース非存在下でも強いカルシウムオシレーションを引き起こした (図 9d-f)。こうした SU 剤がもたらす持続的なカルシウム上昇はカルシウム毒性やアポトーシスの引き金となり膵 β 細胞に対する直接的な傷害性の原因となり得る (Iwakura et al., 2000; Maedler et al., 2005)。

#### 4.2.4 GPR40 下流におけるセカンドメッセンジャー IP<sub>3</sub>, DAG の寄与

GPR40 下流の 2 つの主要なセカンドメッセンジャーのカルシウムオシレーション及びインスリン分泌への役割を膜透過性 IP<sub>3</sub>, DAG アナログを用いて解析した。まず IP<sub>3</sub> アナログはファシグリファミン同様、グルコース依存性にカルシウムオシレーションの振幅及びインスリン分泌を増強した (図 8, 図 10a-c)。他方 DAG アナログはグルコース依存性インスリン分泌を増強したがカルシウムオシレーションへは殆ど影響を与えなかった (図 8, 図 10d-f)。DAG は PKC ファミリーを活性化し

ンスリン顆粒のエキソサイトーシスを増幅することが知られている。10 個のアイソフォームのうち PKC $\alpha$  と  $\epsilon$  がその豊富な発現量 (補図 1) と細胞内局在 (Yedovitzky et al., 1997) から最も寄与が高いと推察される。最近、DAG によって直接的にあるいは PKC を介して間接的に活性化される PKD (protein kinase D) が F- アクチンの脱重合と細胞骨格の再構成を介して GPR40 活性化によるインスリン分泌促進作用に寄与するのではないかとの報告がなされたが (Ferdaoussi et al., 2012; Kong et al., 2010)、そのようなメカニズムも一部関与しているかもしれない。

#### 4.2.5 カルシウムダイナミクスと DAG 刺激の相乗作用

図 11a に示した通り、電位依存性の L 型カルシウムチャンネルを介した細胞外からのカルシウムイオン流入はファシグリファミンによるインスリン分泌促進作用においても欠かせないものであった。興味深いことにグルコース非存在下でみられる同チャンネルの開口薬である (S)-(-)-Bay K 8644 によるごく僅かなインスリン分泌促進作用が OAG 刺激で顕著に、あるいは相乗的に増強されたことは (図 11b,c)、前項で述べた通り DAG がカルシウムイオン流入以降のインスリン分泌機構を増強した可能性を示唆した。PKC のうち conventional PKC (cPKC: PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の 3 つ) は DAG とカルシウム結合部位の双方を持つことからこれら因子の関与が単なる相加作用ではない、相乗的なインスリン分泌促進作用を生み出すのかもしれない。

#### 4.2.6 GPR40 作動薬ファシグリファミンの薬効発現機構解明に関する小括

以上の検討から私は GPR40 作動薬あるいはファシグリファミンを持つグルコース依存性インスリン分泌促進作用をもたらす下流 G $\alpha$ q シグナルの役割について、脂肪酸代謝や  $\beta$ -アレスチンシグナルの寄与に関する最近の知見 (Kristinsson et al., 2015; Mancini et al., 2015) に加えて図 12 に示すような薬効の発現機構を提示した。すなわち、グルコース代謝に始まり細胞外カルシウムの流入、インスリン顆粒の分

泌へと繋がる一連のグルコース依存性インスリン分泌機構に対して GPR40 下流シグナルは、(1) IP<sub>3</sub> 受容体の活性化を介した小胞体からのカルシウム放出がもたらすカルシウムオシレーションの増強、(2) PKC 活性化を介した下流での分泌機構に対するカルシウムダイナミクスとは独立かつ相乗的な増強、の 2 段階で作用するモデルを考えた。ファシグリファムは 2013 年末、肝臓に対する安全性懸念から臨床第 3 相試験で開発中止となったが GPR40 作動薬は依然として魅力的な新規メカニズムと考えられており前臨床及び臨床試験段階で様々な化合物が開発中である (Mancini and Poitout, 2015)。肝臓における毒性の原因については不明であるがこれまでの知見から少なくとも肝臓における GPR40 の発現は低いと考えられ (Briscoe et al., 2003; Itoh et al., 2003)、間接的な作用もしくは化合物物性由来の可能性はある。本研究で得られた知見が 2 型糖尿病治療における GPR40 作動薬創製の一助となれば幸いである。

## 5. 図表

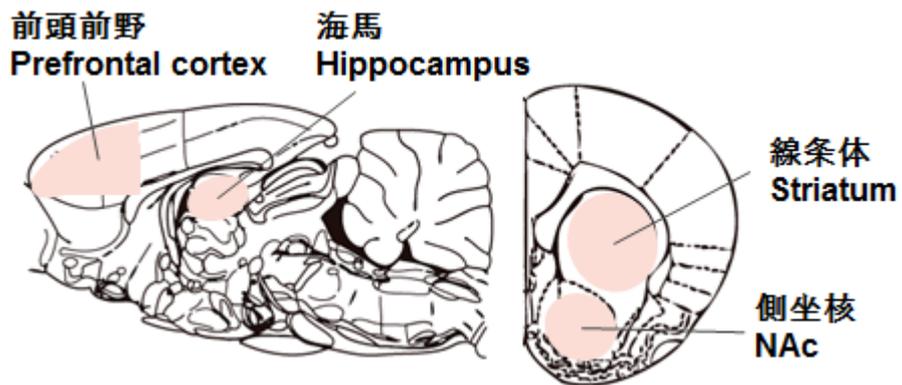
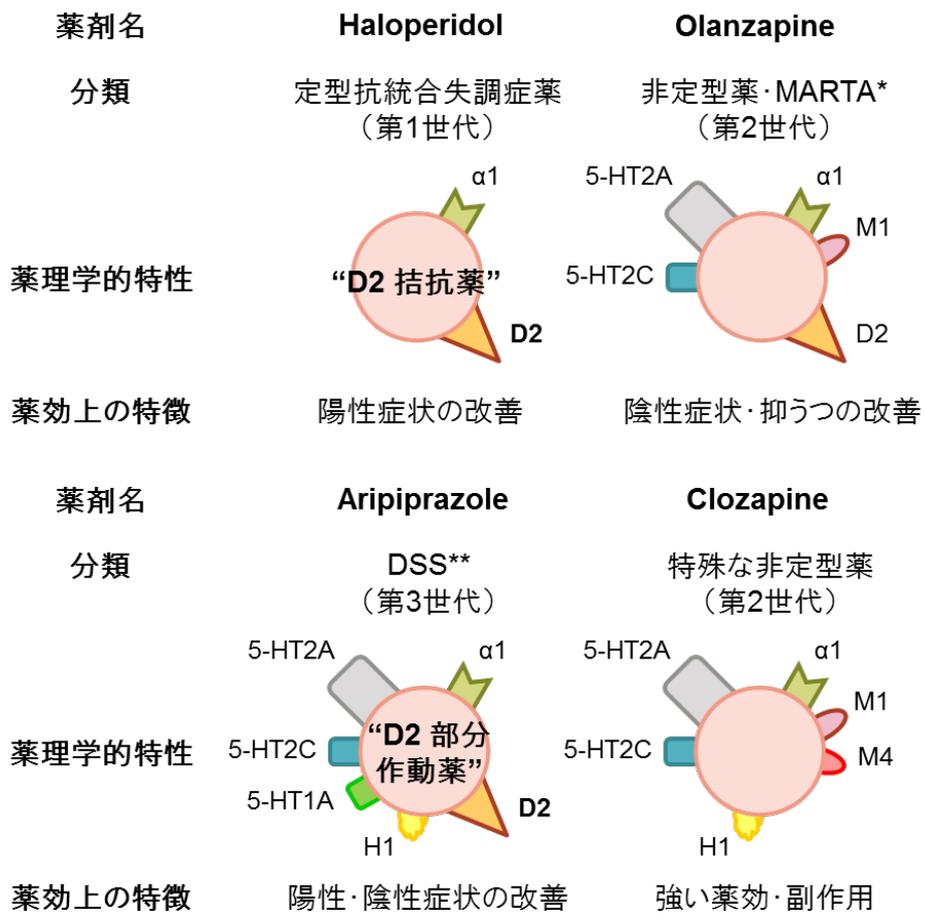


図1 解析対象とした脳部位の模式図。Paxinos と Watson の著作による「ラット脳の定位座標図」(Paxinos and Watson, 1998) をもとに作成した。



\* Multi-Acting Receptor-Targeted Antipsychotics; 多元受容体標的化抗統合失調症薬  
 \*\* Dopamine System Stabilizer; ドパミンシグナル伝達を適度に抑える“安定化”薬

図2 様々な GPCR を標的とする統合失調症に対する既存治療薬の代表例。受容体に対する薬理学的特性については、Correll の参考文献 (Correll, 2010) において阻害定数  $K_i$  値が 100 nM 未満のものを示した。

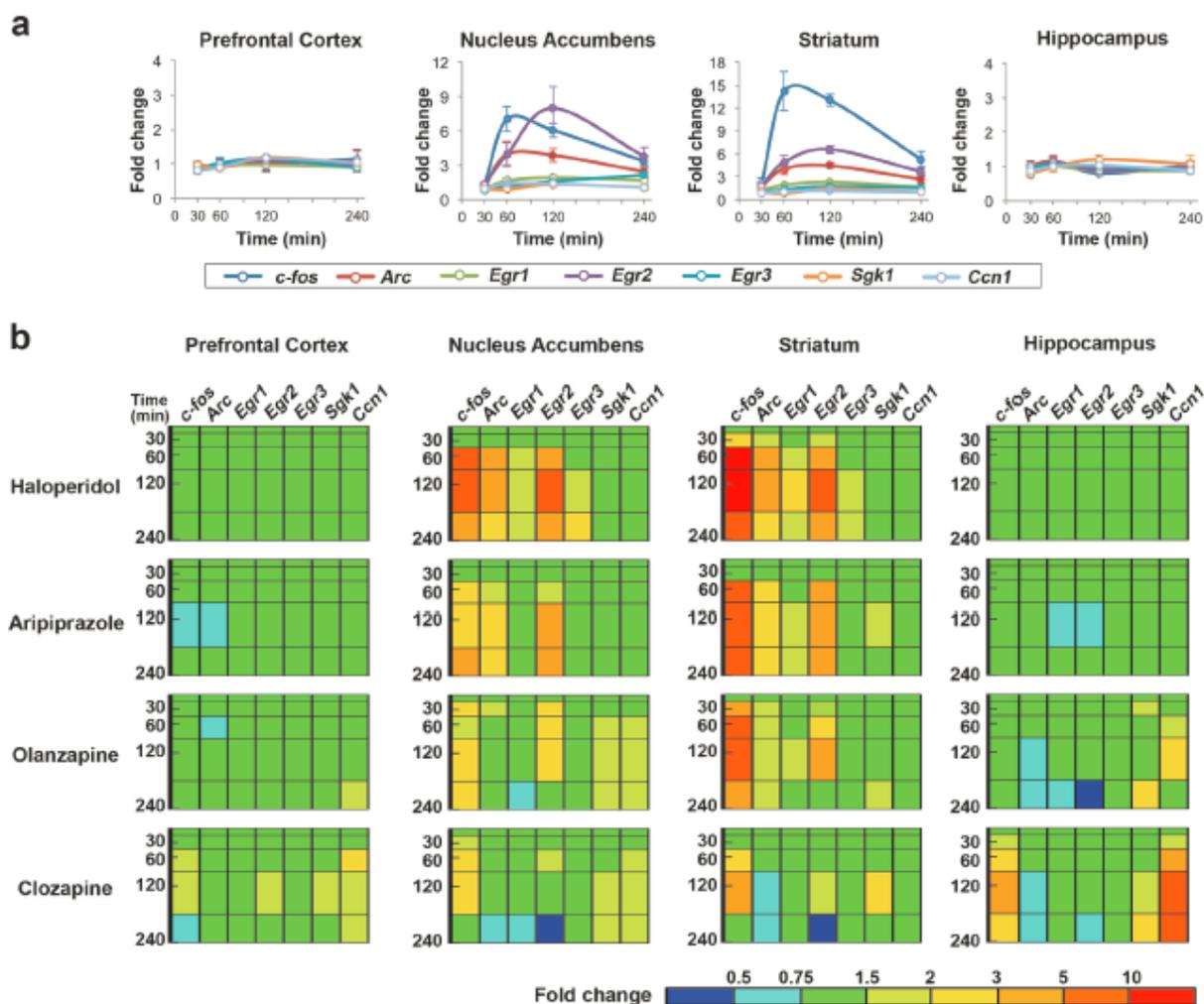


図3 代表的な既存抗統合失調症薬は側坐核及び線条体を中心に特徴的な一過性のIEGs 発現上昇を示す

(a) 定型統合失調症薬ハロペリドール 0.3 mg/kg 経口投与による IEGs 発現上昇のタイムコース試験。データは対照群に対する発現変動比を示し、n=5 の平均値± 標準偏差で示した。各時点において中が塗りつぶされた丸で示されるデータは対応する対照群との比較で統計学的に有意であったものを示す (Welch の t 検定、 $p < 0.05$ )。

(b) 代表的な既存抗統合失調症薬 4 剤による IEG の発現変動タイムコースのトランスクリプトームフィンガープリント (transcriptome fingerprint: TFP)。このように発現変動を表すヒートマップのことを本研究では González-Maeso らの先行研究に倣い “トランスクリプトームフィンガープリント” と呼ぶことにする

(Gonzalez-Maeso et al., 2007; Gonzalez-Maeso et al., 2003)。色見本と発現変動レベルの対応を右下に示す。(a) のハロペリドールその他 3 剤の投与量はアリピプラゾール 3 mg/kg、オランザピン 10 mg/kg、クロザピン 30 mg/kg のいずれも経口投与。

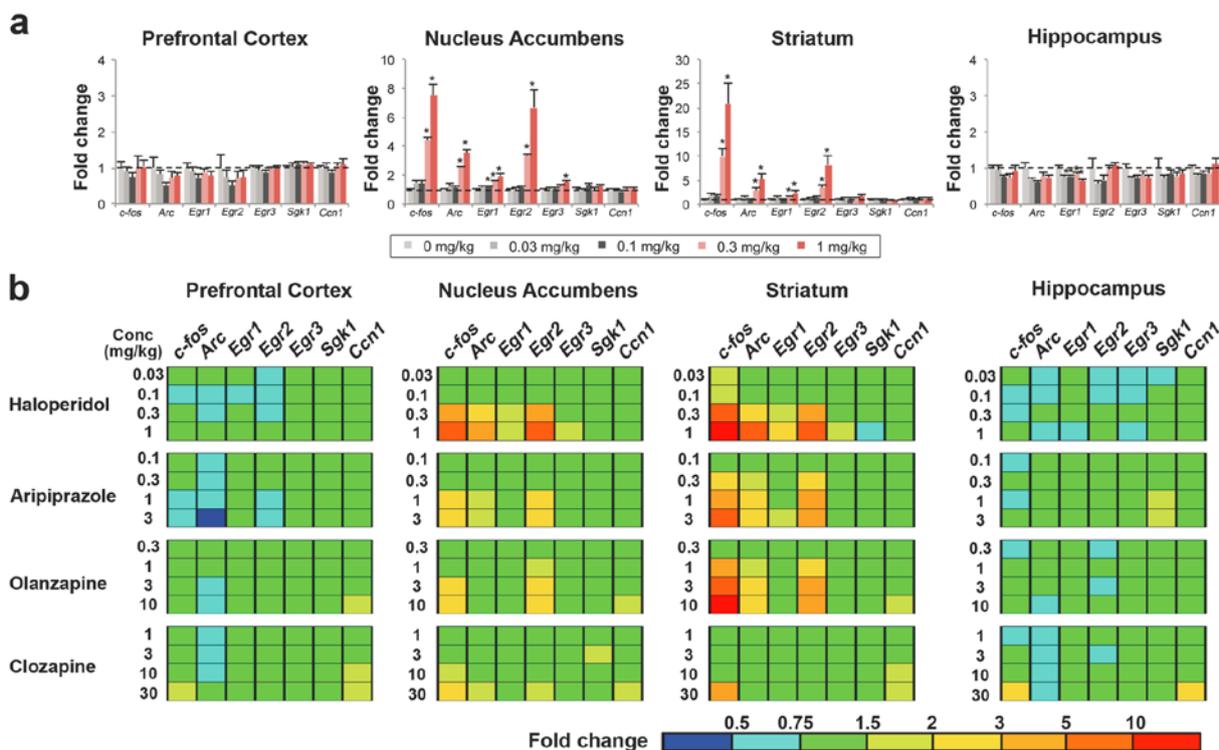


図4 ハロペリドール、アリピプラゾール、オランザピンの3剤は用量依存性試験においても側坐核及び線条体における *c-fos*, *Arc*, *Egr2* の発現上昇を特徴とする

(a) ハロペリドール 0.03~1 mg/kg 経口投与後 1 時間での IEGs 発現変動の用量依存性。*c-fos*, *Arc*, *Egr1*, *Egr2* の側坐核及び線条体における発現上昇は用量依存性を示した。データは対照群に対する発現変動比を示し、 $n=4\sim5$  の平均値 $\pm$  標準偏差で示した。グラフ中水平に引いた点線は対照群の変動を 1 とした基準線を示す。グラフ中 (\*) は対照群との比較で統計学的に有意であったものを示す (Williams 検定、 $p < 0.025$ )。

(b) 代表的な既存抗統合失調症薬 4 剤による IEG の発現変動用量依存性の TFP。ハロペリドール、アリピプラゾール、オランザピンの 3 剤で用量依存的な側坐核と線条体における *c-fos*, *Arc*, *Egr2* の発現上昇が認められた。ハロペリドール、オランザピン、クロザピンについては投与後 1 時間のサンプリング (各 0.03~1 mg/kg、0.3~10 mg/kg、1~30 mg/kg)、アリピプラゾールのみ 2 時間のサンプリング (0.1~3 mg/kg)、いずれも経口投与。

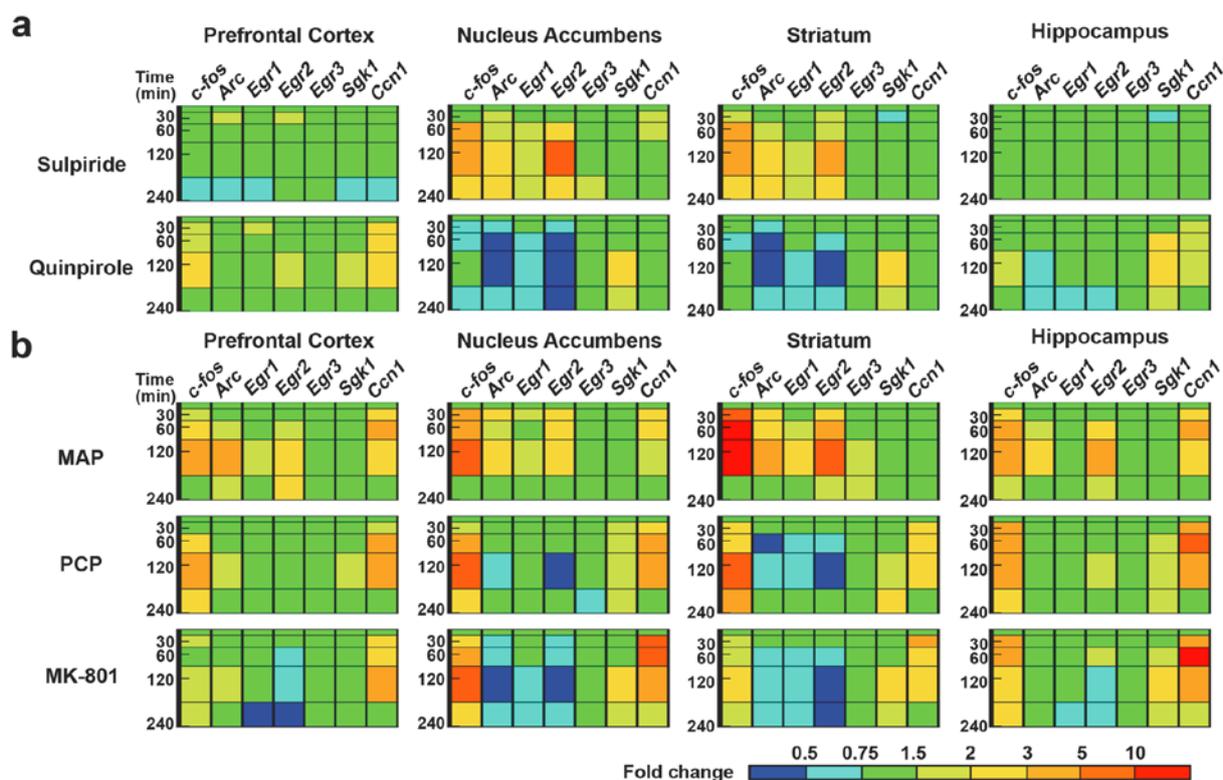


図5 D2R 遮断薬は既存薬3剤と類似性の高いプロファイルを示し、D2R 作動薬や NMDA 受容体遮断薬は対照的なプロファイルを示す

(a) 選択的 D2R 遮断薬スルピリド (100 mg/kg, 静脈内投与) 及び作動薬キンピロール (10 mg/kg, 静脈内投与) 投与による TFP。スルピリドは側坐核及び線条体で *c-fos*, *Arc*, *Egr1*, *Egr2* を発現誘導しキンピロールはそれらの発現低下をもたらした。その他キンピロールは4部位全てにおける *Sgk1* の発現上昇、前頭前野と海馬での *Ccn1* の発現上昇を示した。

(b) 薬剤誘発モデルに用いられるメタンフェタミン (MAP, 3 mg/kg, 皮下投与) 及び NMDA 受容体遮断薬2種 (フェンサイクリジン (PCP, 10 mg/kg, 皮下投与), MK-801 (1 mg/kg, 皮下投与)) による TFP。MAP は全部位で *c-fos*, *Arc*, *Egr2*, *Ccn1* の顕著な上昇、NMDA 受容体遮断薬2種は側坐核及び線条体で *Arc*, *Egr2* の低下を示した。

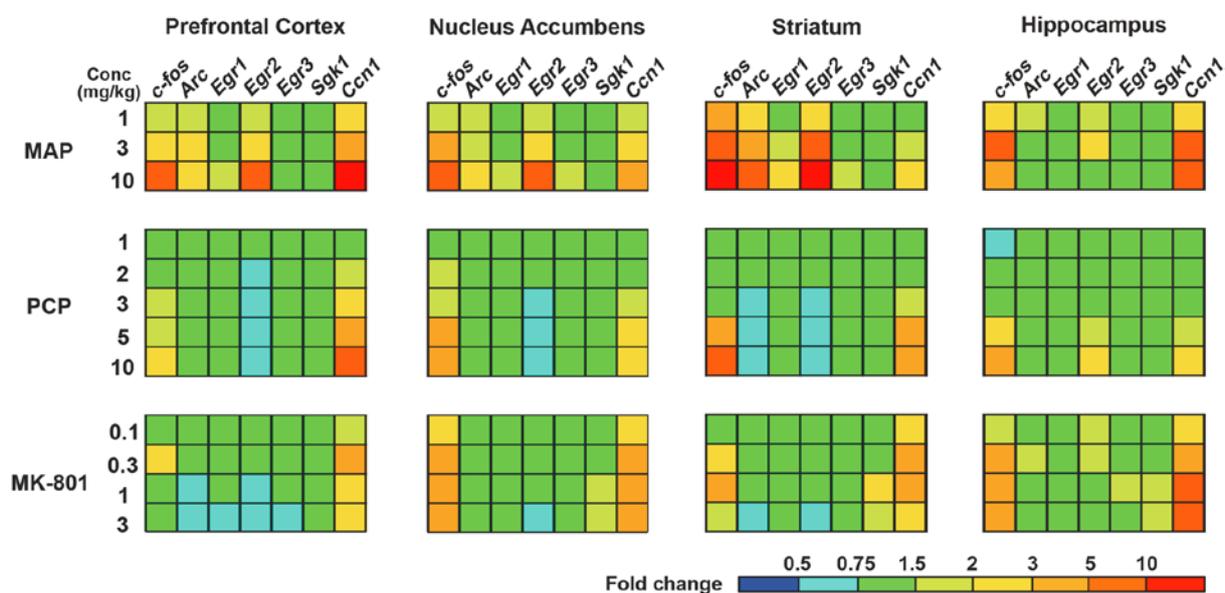


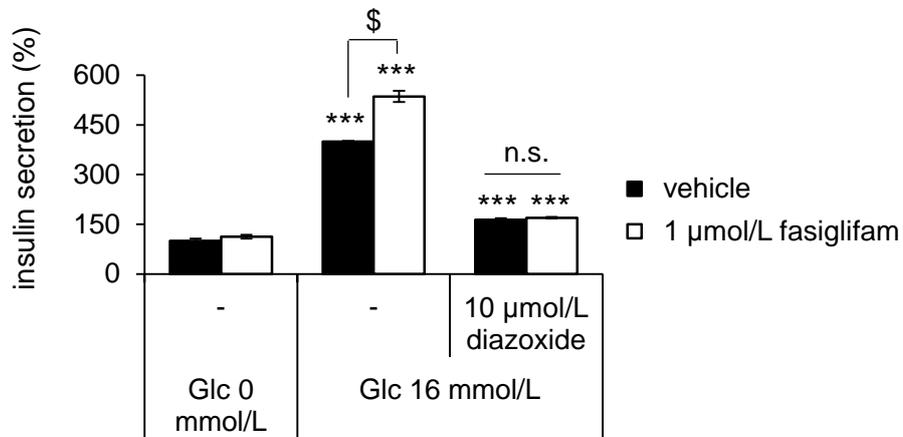
図6 NMDA受容体遮断薬は側坐核や線条体においてD2R遮断薬と対照的な発現誘導を示しメタンフェタミンは*c-fos*, *Arc*, *Egr2*, *Ccn1*の発現を全4部位で顕著に上昇させる

MAP、PCP、MK-801の用量依存性試験のTFP。それぞれ皮下投与後1時間のサンプリング（各1~10 mg/kg、0.1~3 mg/kg、0.1~3 mg/kg）。

Gene	Accession number		Sequence 5' - 3'
<i>c-fos</i>	NM_010234	Sense primer Antisense primer Probe Oligo template	5'- AGCCTTTCCTACTACCATTC -3' 5'- GTTGGAAGCTAGAGACGGACAG -3' 5'- CCGACTCCTTCCAGCATGGGCTCT -3' 5'- GGGACAGCCTTTCCTACTACCATTCAGCCGACTCCTTCTCCA GCATGGGCTCTCTGTCAACACACAGGACTTTTGGCAGATCTGTCC GTCTCTAGTGCCAACTTTAT -3'
<i>Arc</i>	BC023127	Sense primer Antisense primer Probe Oligo template	5'- AGCTGAAGCCACAAATGCAG -3' 5'- CTGAGTCACGAGCTGAGC -3' 5'- AGACCTGACATCCTGGCACCTCTGG -3' 5'- GGGTGAAGCTGAAGCCACAAATGCAGCTGAAGCAGCAGACCTGA CATCTGGCACCTCTGGCCCCAGTGATTCATACCAAGTGAAGAAG AGCAGAGCTCAGCTCCGTGACTCAGCCATG -3'
<i>Egr1</i>	NM_007913	Sense primer Antisense primer Probe Oligo template	5'- CCCTATGAGCACCTGACCAC -3' 5'- AGGCAACCGAGTCGTTTGG -3' 5'- AACTCGTCTCCACCATCGCCTTCTCA -3' 5'- AACAAACCTATGAGCACCTGACCACAGAGTCCCTTTCTGACATCG CTCTGAATAATGAGAAGGCGATGGTGGAGACGAGTTATCCCAGCCA AACGACTCGGTTGCTCCCAT -3'
<i>Egr2</i>	NM_010118	Sense primer Antisense primer Probe Oligo template	5'- CTCGTCGGTGACCATCTTCC -3' 5'- TTCTCTCCAGTCATGTCAATGTTG -3' 5'- TGCCATCTCCCGCCACTCCGTTCA -3' 5'- GCCGCTCGTCGGTGACCATCTTCCCAATGGTGAAGTGGGAGG CCCCTTTGACCAGATGAACGGAGTGGCGGGAGATGGCATGATCAA CATTGACATGACTGGAGAGAAGAGAC -3'
<i>Egr3</i>	NM_018781	Sense primer Antisense primer Probe Oligo template	5'- CGCGCTCAACCTCTTCTCC -3' 5'- GGGCTTCTCGTTGGTCAGAC -3' 5'- CAGCAGCGACTCGGTAGCCATTACA -3' 5'- CCCAGCGCGCTCAACCTCTTCCGGCAGCAGCGACTCGGTAGC CCATTACAATCAGATGGCTACAGAGAATGTGATGGACATCGGTCTGA CCAACGAGAAGCCCAATCC -3'
<i>Sgk1</i>	NM_011361	Sense primer Antisense primer Probe Oligo template	5'- TATTGAGCATAACGGGACAACATC -3' 5'- GGCTGCTTATGAGGACCTC -3' 5'- TGGCACGCCTGAGTATCTGGCTCC -3' 5'- GAGAATATTGAGCATAACGGGACAACATCTACCTTCTGTGGCAC GCCTGAGTATCTGGCTCTGAGGCTCCATAAGCAGCCGTATG -3'
<i>Ccn1</i>	NM_010516	Sense primer Antisense primer Probe Oligo template	5'- AATTGAAAAGGCAGCTCACTG -3' 5'- CGTGCAAGGGTTGAAAAGAAC -3' 5'- TTCCTGTCTTTGGCACCGAACCGC -3' 5'- ATCGCAATTGAAAAGGCAGCTCACTGAAGAGGCTTCTGTCTTT GGCACCGAACCGGAGTTCTTTTCAACCTCTGCACGCCAT -3'
<i>Cyclophilin A</i>	NM_008907	Sense primer Antisense primer Probe Oligo template	5'- GCCGATGACGAGCCCTTG -3' 5'- TAGCCAAATCCTTCTCTCCAGTG -3' 5'- CCGCTCTCCTTCGAGCTGTTTGCA -3' 5'- TCACGGCCGATGACGAGCCCTTGGGCCGCTCTCTCTCGAGC TGTTTGCAGACAAAGTTCAAAGACAGCAGAAAACCTTCGAGCTCTG AGCACTGGAGAGAAAGGATTTGGCTATAAGG -3'

表1 マウス TaqMan プライマープローブ, オリゴテンプレートの配列

**a**



**b**

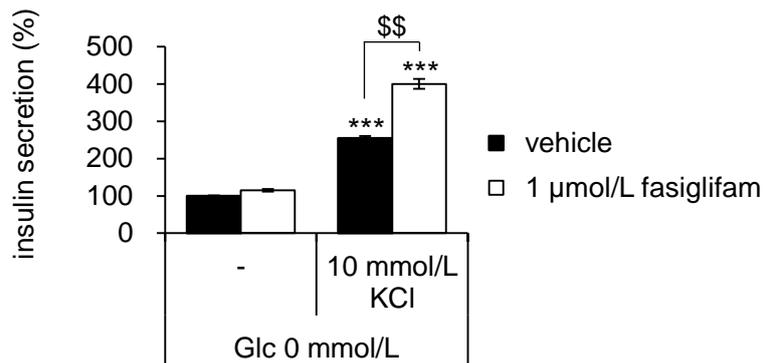


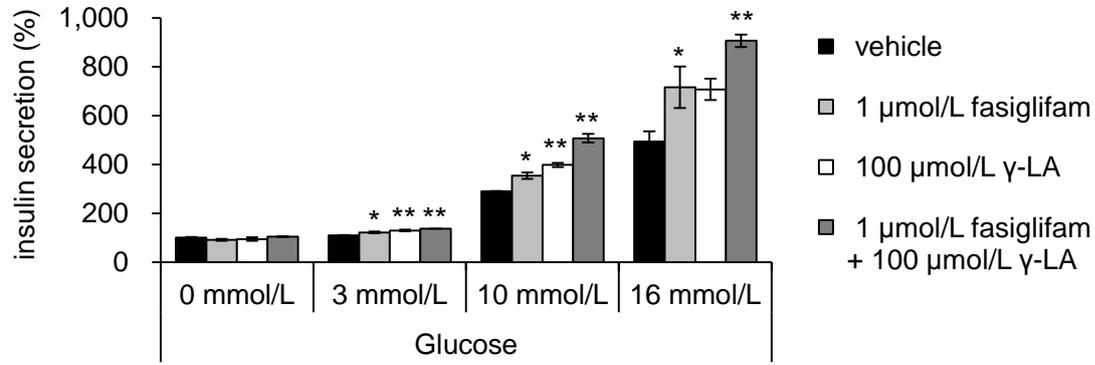
図7 ファシグリファムは細胞膜の脱分極発生下でそのインスリン分泌促進作用を發揮する

(a) 膵β細胞株 MIN6 におけるファシグリファム (1 μmol/L) のグルコース依存性インスリン分泌促進作用に対する ATP 感受性カリウム ( $K_{ATP}$ ) チャンネル開口薬ジアゾキシド (100 μmol/L) の作用。(b) グルコース非存在下で塩化カリウム (KCl, 10 mmol/L) による脱分極によって誘発されたインスリン分泌に対するファシグリファム (1 μmol/L) の作用。

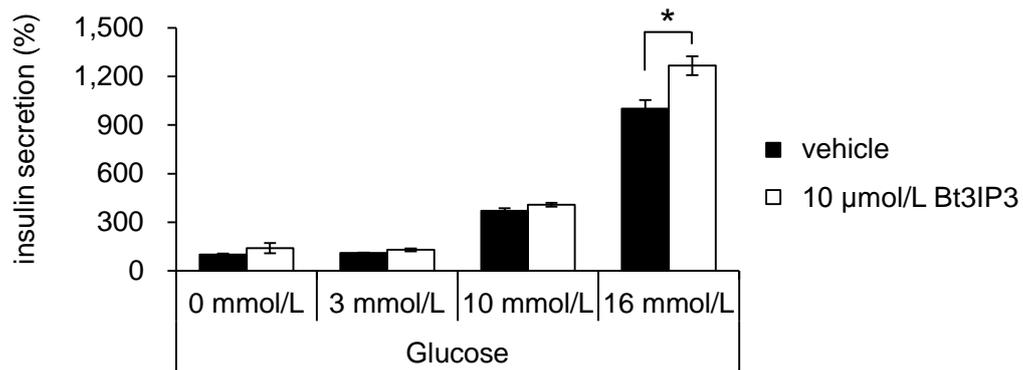
いずれもデータはグルコース 0 mmol/L 無処置群を 100% として表示し、n= 3 の平均値± 標準偏差で示した。グラフ中 (\*\*\*) はグルコース 0 mmol/L の無処置群との比較で統計学的に有意であったもの (Dunnett の多重比較検定、 $p < 0.001$ )、(\$, \$\$)

は2群の比較で有意であったもの（Welchのt検定、 $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ）を示す。

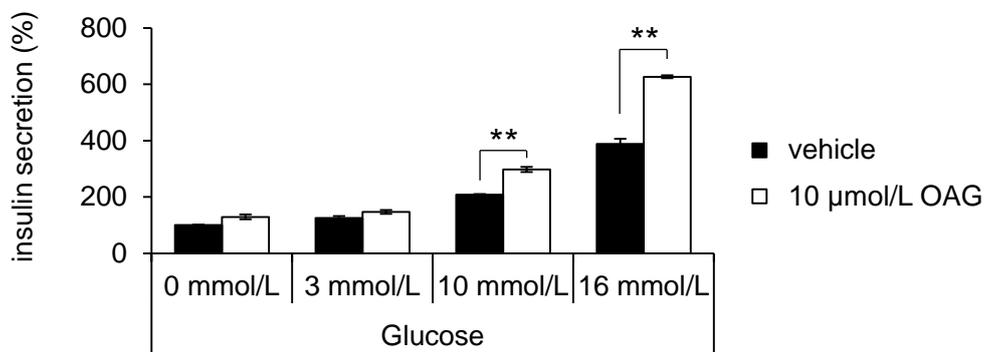
**a**



**b**

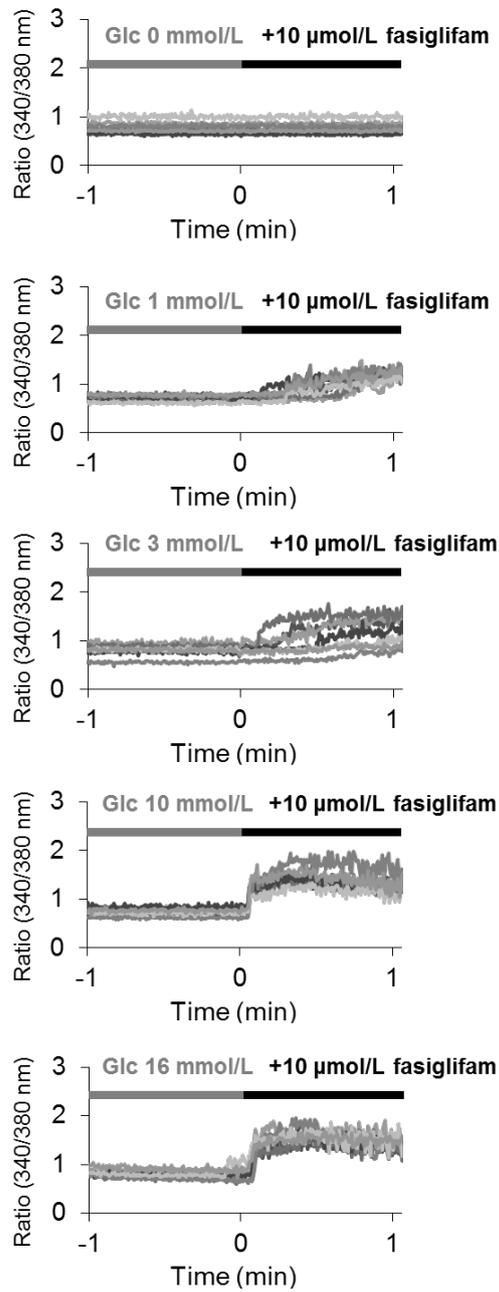
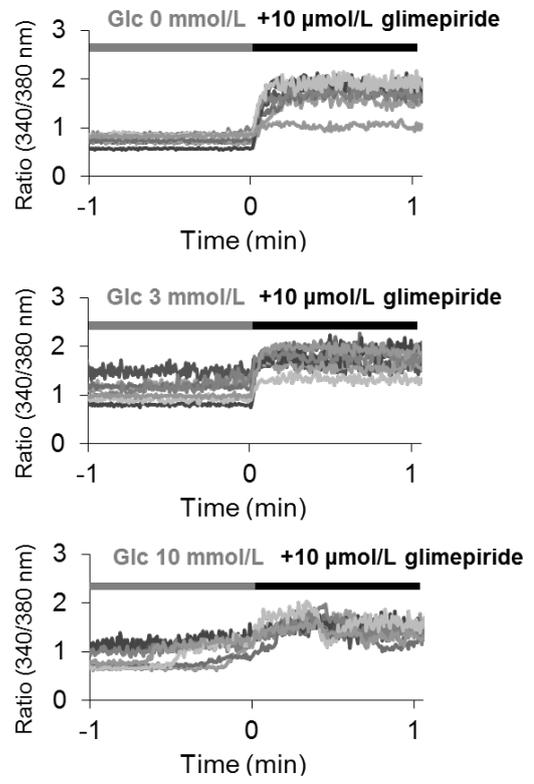


**c**



**図 8**  $IP_3/Ca^{2+}$ , DAG/PKC 経路のそれぞれが GPR40 下流でグルコース依存性インスリン分泌促進作用に寄与する

**(a)** MIN6 におけるファシグリファミのグルコース依存性インスリン分泌促進作用と内在性リガンドである中長鎖脂肪酸、 $\gamma$ -リノレン酸との相互作用。いずれもデータはグルコース 0 mmol/L 無処置群を 100 % として表示しており、 $n=3$  の平均値 $\pm$  標準偏差で示した。グラフ中 (\*, \*\*) は各グルコース濃度の無処置群との比較で統計学的に有意であったもの (Dunnett の多重比較検定、 $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) を示す。**(b)**  $IP_3$  の膜透過性アナログ ( $Bt_3IP_3$ ) による  $IP_3$  受容体活性化のグルコース依存性インスリン分泌作用に及ぼす影響。二元配置分散分析によるグルコースと  $Bt_3IP_3$  の主効果及び交互作用の結果 ; グルコースの主効果  $p < 0.01$ 、 $Bt_3IP_3$  の主効果  $p < 0.01$ 、グルコースと  $Bt_3IP_3$  の交互作用  $p < 0.01$ 。グラフ中 (\*) は各グルコース濃度の無処置群との比較で統計学的に有意であったもの (Welch の t 検定、 $p < 0.05$ ) を示す。**(c)** DAG の膜透過性アナログ (OAG) による PKC 活性化のグルコース依存性インスリン分泌作用に及ぼす影響。二元配置分散分析によるグルコースと OAG の主効果及び交互作用の結果 ; グルコースの主効果  $p < 0.01$ 、OAG の主効果  $p < 0.01$ 、グルコースと OAG の交互作用  $p < 0.01$ 。グラフ中 (\*\*) は各グルコース濃度の無処置群との比較で統計学的に有意であったもの (Welch の t 検定、 $p < 0.01$ ) を示す。

**a****d**

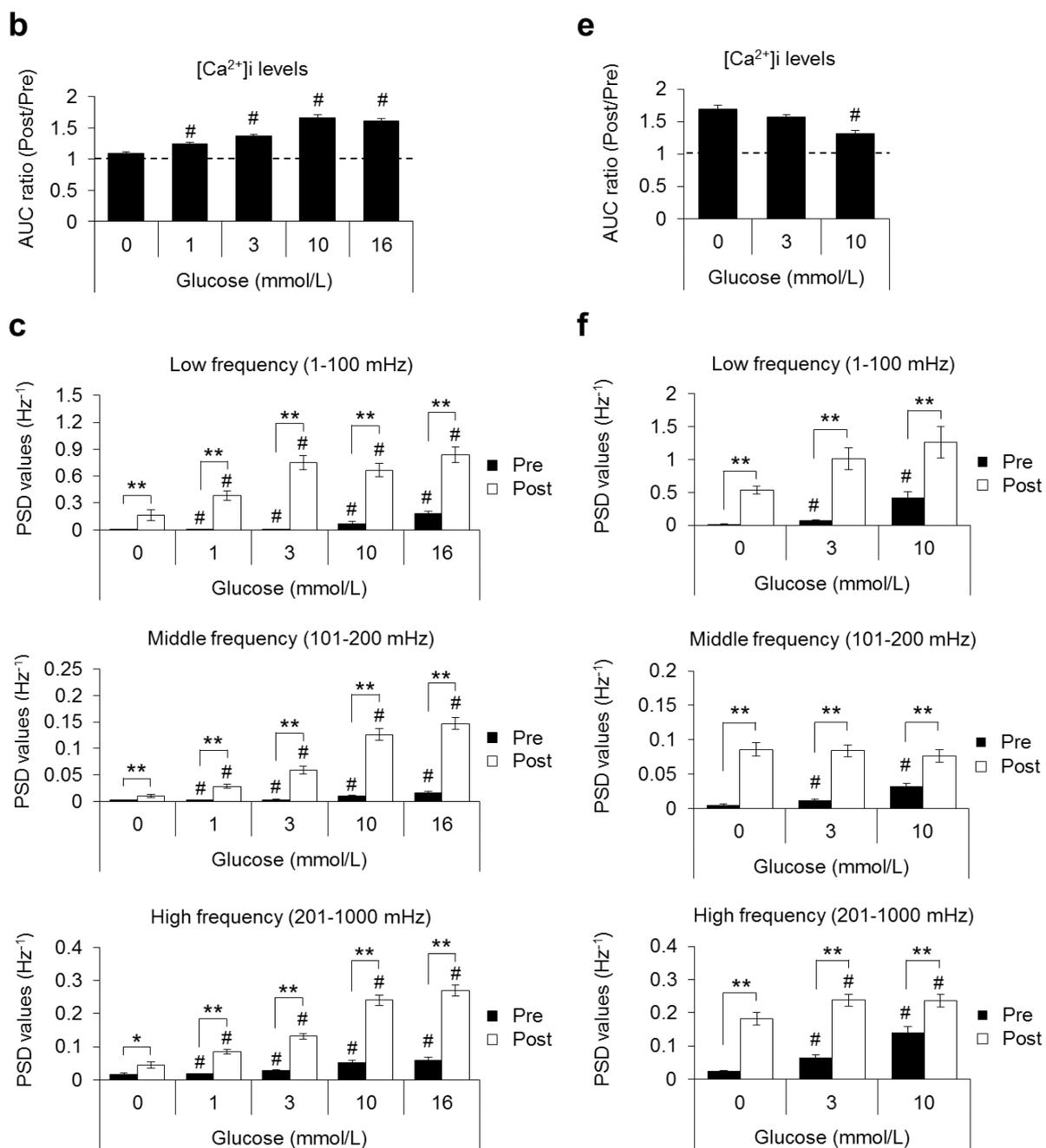
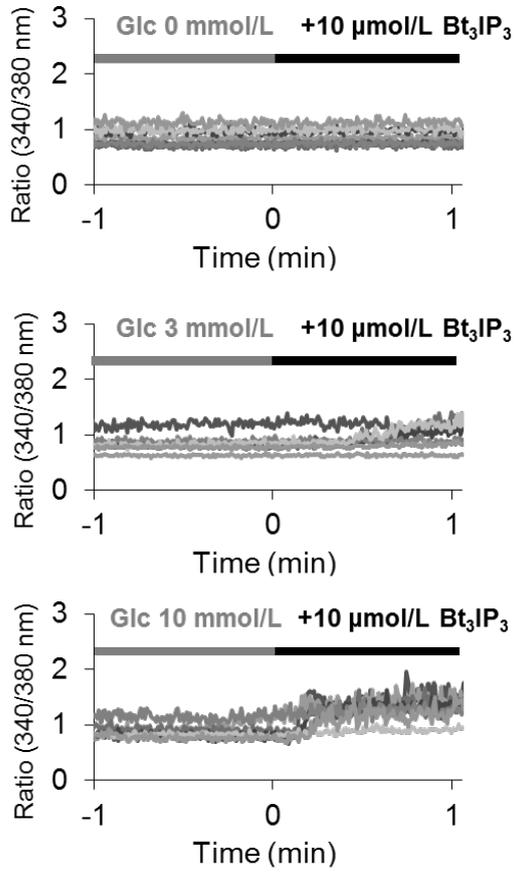
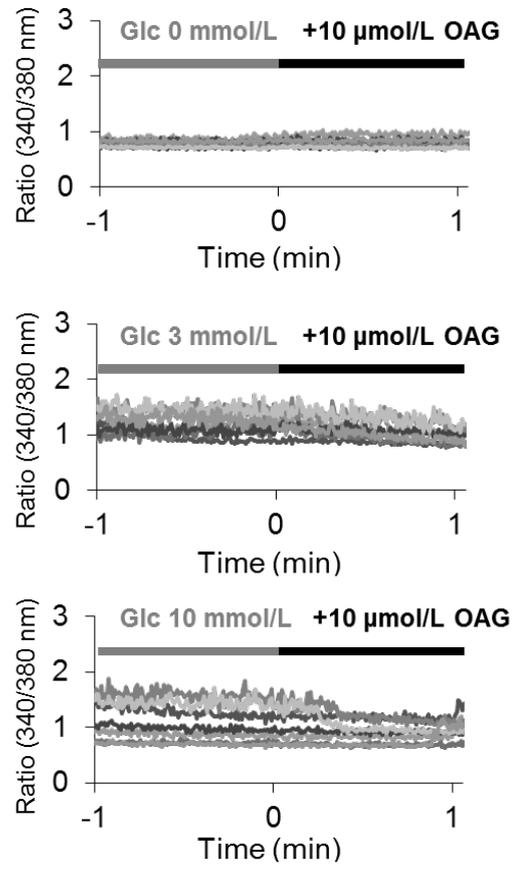
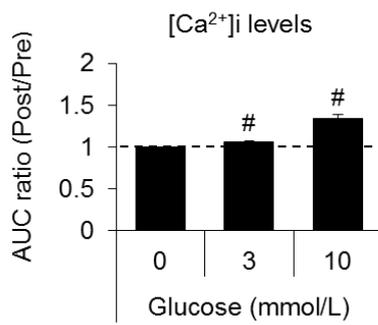
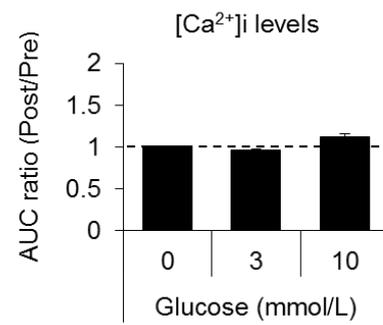


図9 ファシグリファムはグルコース濃度依存的にカルシウムオシレーションの振幅を周波数に依らず上昇させ、グルコース濃度非依存的なSU剤とは作用が異なる

MIN6 細胞の細胞質におけるカルシウムダイナミクスを Fura-2 AM で可視化し、  
**(a)-(c)** ファシグリファム 10 μmol/L、**(d)-(f)** グリメピリド 10 μmol/L で刺激した。

**(a), (d)** 各グルコース濃度における刺激前後のカルシウムダイナミクスの代表例。1  
 回の実験につきランダムに選んだ 21 箇所 (region of interest: ROI) のうち 7 箇所 (ROI

#1~7) の波形を示した。(b), (e) 細胞内カルシウムの刺激による変化。刺激前後の 1 分間の AUC (area under the curve) を求め、刺激後/刺激前の比 (Post/Pre) を算出した。データは 3 回の実験で得た計 63 ROIs の平均値± 標準偏差で示した。(c), (f) それぞれの周波数帯におけるオシレーションの波の強度を表すパワースペクトル密度 (Power spectrum density: PSD)。PSD は振幅の 2 乗に比例するパラメーターであり、ここでは 3 つの周波数帯 (Low: 1~100 mHz, Middle: 101~200 mHz, High: 201~1000 mHz) ごとに分けた。本検討におけるナイキスト周波数 (サンプリング周波数の 1/2 に相当しこれ以上は折り返し現象を生む周波数) はおよそ 1000 mHz であった。データは 3 回の実験で得た計 63 ROIs の平均値± 標準偏差、(#)はグルコース 0 mmol/L 群に対する統計学的有意性 (Williams 検定 (片側)、 $p < 0.025$ ) を示し、(\*, \*\*) は 2 群の比較で有意であったもの (Welch の t 検定、 $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) を表した。

**a****d****b****e**

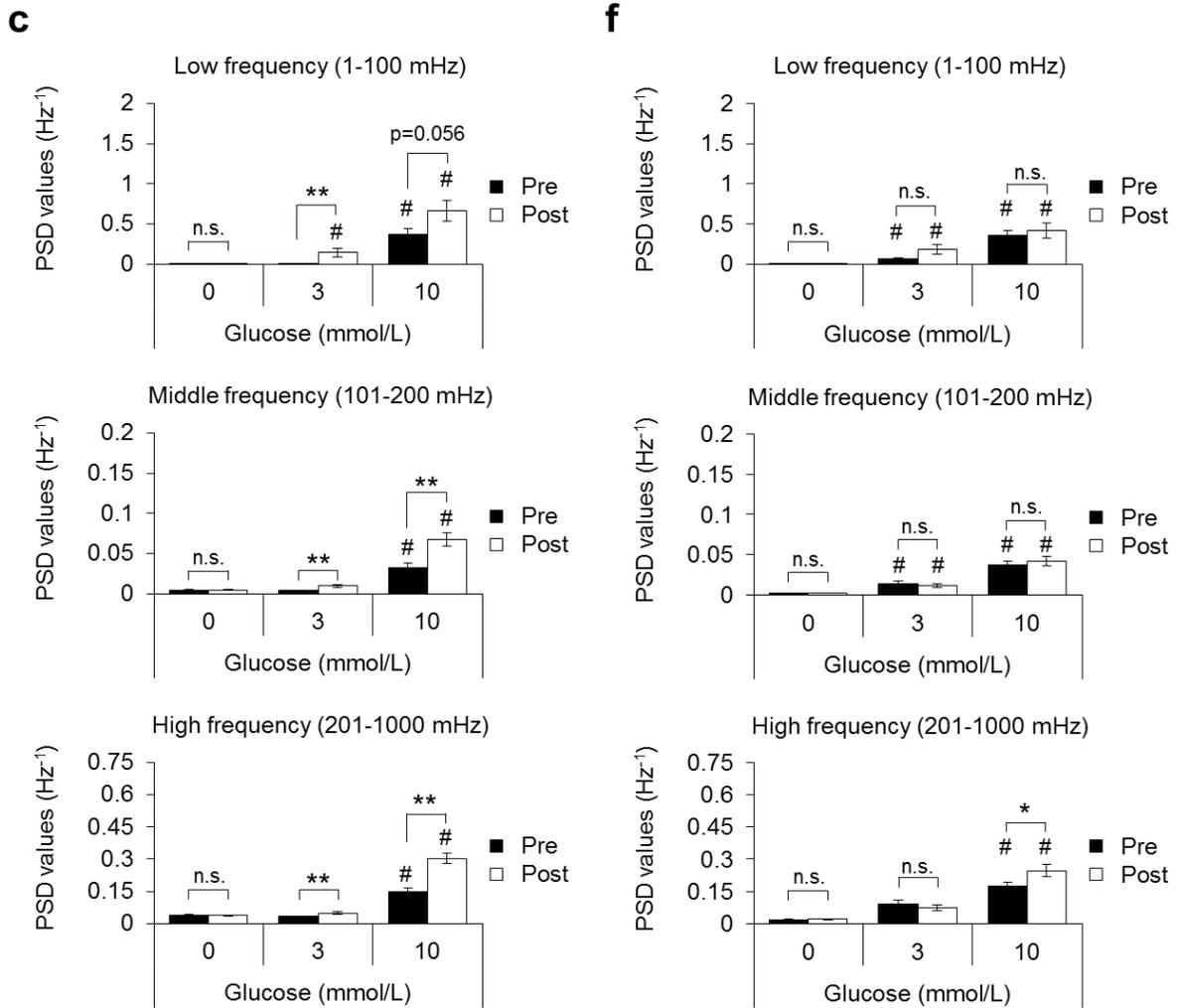


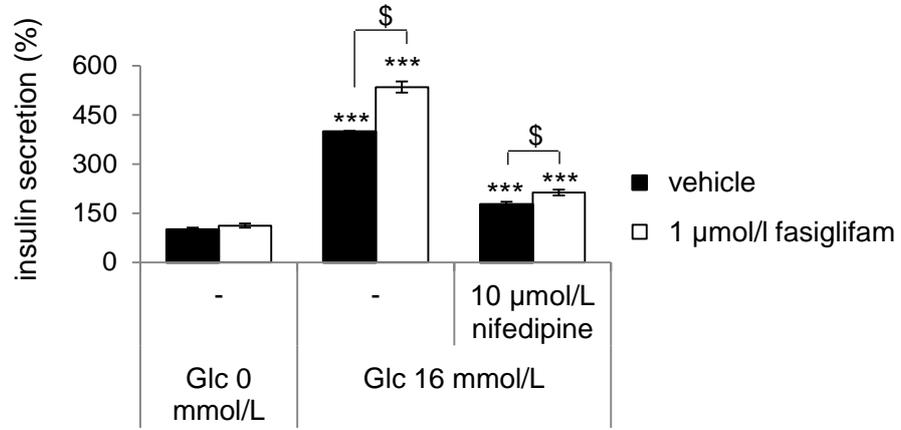
図 10 IP<sub>3</sub> 受容体刺激はグルコース濃度に応じてカルシウムオシレーションを増強し DAG 刺激による PKC 活性化はそれらに殆ど影響を与えない

図 9 と同様、MIN6 細胞の細胞質におけるカルシウムダイナミクスを Fura-2 AM で捉え、(a)-(c) IP<sub>3</sub> の膜透過性アナログ (Bt<sub>3</sub>IP<sub>3</sub>) 10 μmol/L、(d)-(f) DAG の膜透過性アナログ (OAG) 10 μmol/L で刺激した。

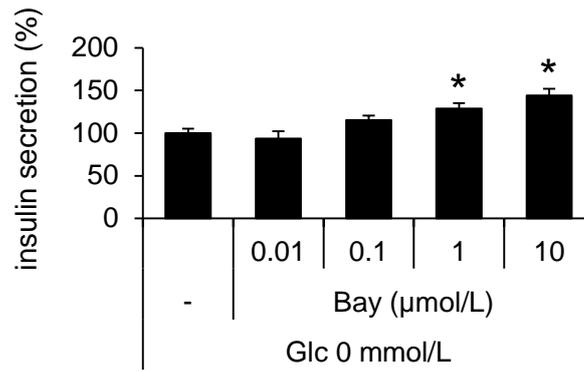
(a), (d) 各グルコース濃度における刺激前後のカルシウムダイナミクスの代表例。1 回の実験につきランダムに選んだ 21 箇所のうち 7 箇所の波形を示した。(b), (e) 細胞内カルシウムの刺激による変化。刺激前後の 1 分間の AUC を求め、刺激後/刺激前の比 (Post/Pre) を算出した。データは 3 回の実験で得た計 63 ROIs の平均値±標準偏差で示した。(c), (f) それぞれの周波数帯におけるオシレーションの波の強度

を表すパワースペクトル密度。データは3回の実験で得た計63 ROIsの平均値±標準偏差、(# )はグルコース0 mmol/L群に対する統計学的有意性 (Williams 検定 (片側)、 $p < 0.025$ ) を示し、(\*, \*\*)は2群の比較で有意であったもの (Welch の t 検定、 $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) を表した。

**a**



**b**



**c**

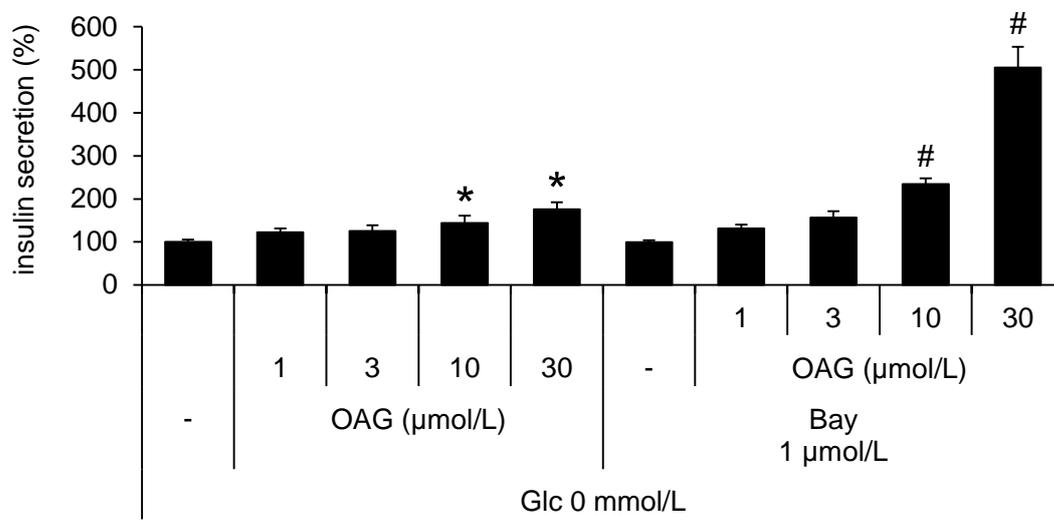


図 11 PKC 活性化と L 型電位依存性カルシウムチャネルを通じた細胞外からのカルシウム流入は相乗的にインスリン分泌を促進する

(a) MIN6 におけるファシグリファム (1  $\mu\text{mol/L}$ ) のグルコース依存性インスリン分泌促進作用に対する L 型電位依存性カルシウムチャネル阻害剤ニフェジピン (10  $\mu\text{mol/L}$ ) の作用。(b) グルコース非存在下における L 型電位依存性カルシウムチャネル開口薬 (S)-(-)-Bay K 8644 (Bay) によるインスリン分泌促進作用。(c) グルコース非存在下における OAG (膜透過性 DAG アナログ) のインスリン分泌促進作用と Bay との相互作用。

いずれもデータはグルコース 0 mmol/L 無処置群を 100% として表示し、n=3 の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。(a) におけるグラフ中 (\*\*\*) はグルコース 0 mmol/L の無処置群との比較で統計学的に有意であったもの (Dunnett の多重比較検定、 $p < 0.001$ )、(\$) は 2 群の比較で有意であったもの (Welch の t 検定、 $p < 0.05$ ) を示す。(b), (c) における (\*) はグルコース 0 mmol/L の無処置群に対する統計学的有意性 (Williams 検定 (片側)、 $p < 0.025$ ) を示し、(c) における (\$) はグルコース 0 mmol/L の Bay 1  $\mu\text{mol/L}$  処置群に対する統計学的有意性 (Williams 検定 (片側)、 $p < 0.025$ ) を示す。二元配置分散分析による OAG と Bay の主効果及び交互作用の結果 ; OAG の主効果  $p < 0.01$ 、Bay の主効果  $p < 0.01$ 、OAG と Bay の交互作用  $p < 0.01$ 。

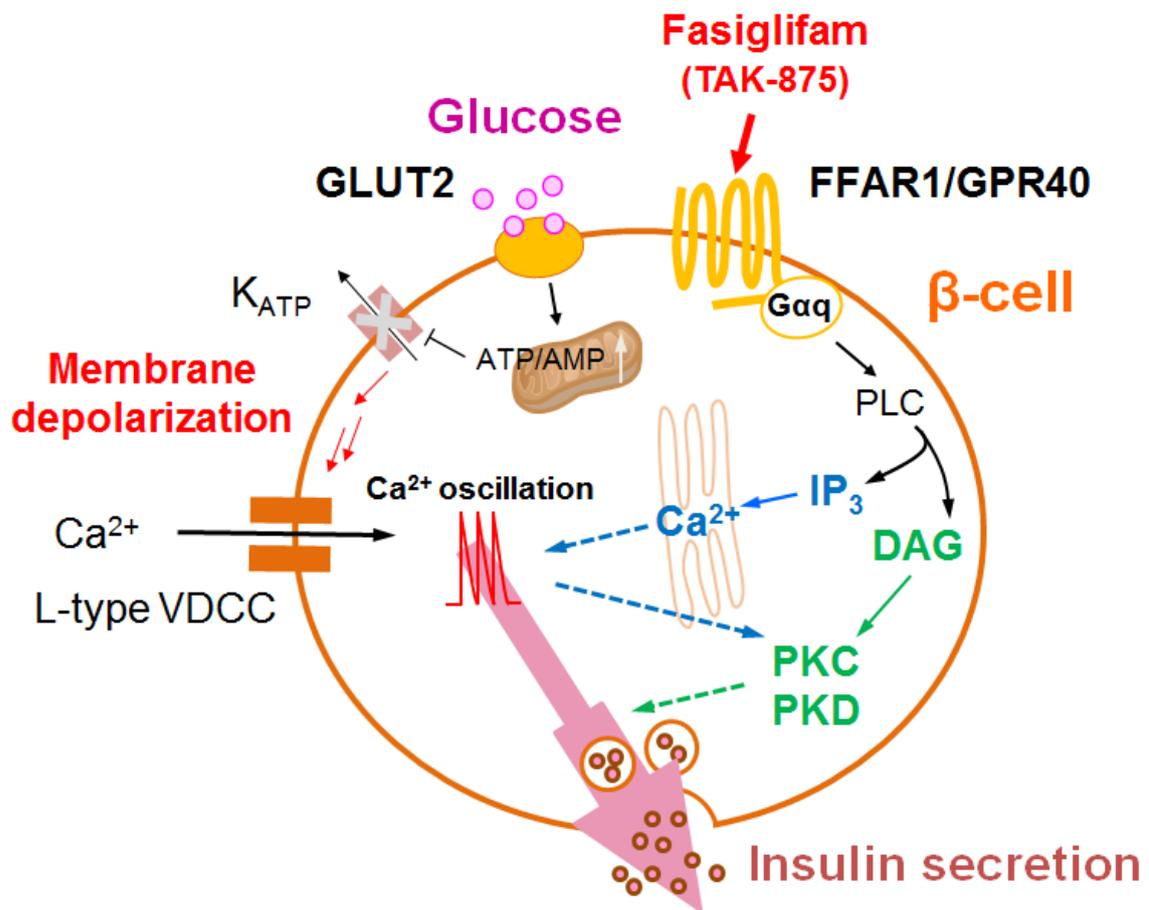
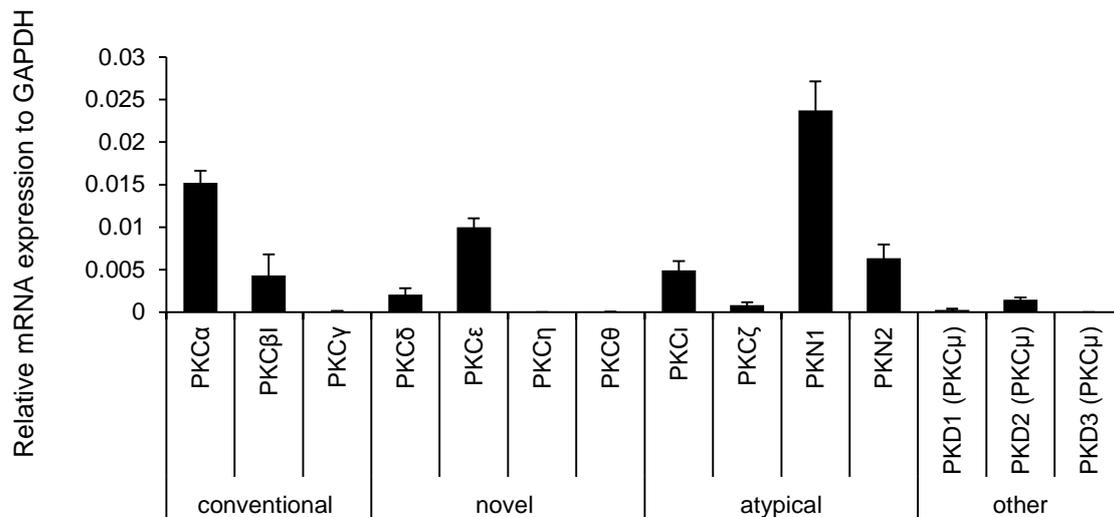


図 12 ファシグリファムによる GPR40 下流シグナルのグルコース依存性インスリン分泌 2 段階促進モデル図。

選択的 GPR40 作動薬ファシグリファムによる GPR40 活性化はグルコースの代謝等で起こる細胞膜の脱分極存在下でのみそのインスリン分泌作用を発揮し、そのメカニズムは (1)  $G_{\alpha q}$  下流の  $IP_3/Ca^{2+}$  経路によるカルシウムオシレーションの増強、(2) DAG/PKC (PKD) 経路による下流の分泌機構の増強の 2 段階の活性化によってもたらされているものと考えられた。



補図 1 MIN6 細胞における PKC, PKD ファミリー遺伝子の mRNA 発現分布

mRNA 発現レベルは qRT-PCR 法で測定し GAPDH 比を比較 Ct 法 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) で求めた。データは 3 回の測定値 (各回 2 ウェルの平均) の平均値 $\pm$  標準誤差で示す。プライマープローブセットは ThermoFisher 社 (旧 Applied Biosystems) の TaqMan Gene Expression assays を用いた。それぞれの ID は、Mm00440858\_m1 (*Prkca*), Mm00435749\_m1 (*Prkcb*), Mm00440861\_m1 (*Prkcg*), Mm00440891\_m1 (*Prkcd*), Mm00440894\_m1 (*Prkce*), Mm00435756\_m1 (*Prkch*), Mm01340228\_m1 (*Prkcq*), Mm00435769\_m1 (*Prkci*), Mm00776345\_g1 (*Prkcz*), Mm00723995\_m1 (*Pkn1*), Mm00618304\_m1 (*Pkn2*), Mm00435790\_m1 (*Prkd1*), Mm00626821\_m1 (*Prkd2*), Mm01232233\_m1 (*Prkd3*)。GAPDH に対してのみ以下の配列の合成プライマープローブを用いた。 Forward primer: 5'-GTCATCATCTCCGCCCTT-3', Reverse primer: 5'-ATATTTCTCGTGGTTCACACCCA-3', TaqMan probe: 5'FAM-TGCCGATGCCCCCATGTTTGT-3'.

## 6. 総括

本研究で私は以下のことを明らかにした。

1. 既存の様々な GPCR を標的とする統合失調症薬や薬剤モデルに用いられる精神刺激薬は下流でそれぞれの共通性や特徴的な薬効を反映するような時空間的な IEGs 発現誘導プロファイルを示し、可塑性の早期マーカーとして疾患関連部位の IEGs 発現プロファイルに着目した *in vivo* スクリーニングは薬剤探索の 1 つの有用な手法と考えられた。

2. GPR40 作動薬ファシグリファムの持つグルコース依存性インスリン分泌促進作用をもたらす下流 Gαq シグナルの役割について、細胞膜の脱分極依存的な (1) IP<sub>3</sub> 受容体の活性化を介した小胞体からのカルシウム放出がもたらすカルシウムオシレーションの増強、(2) PKC 活性化を介した下流での分泌メカニズムに対するカルシウムダイナミクスとは独立かつ相乗的な増強、の 2 段階で作用が発揮されると考えられた。

## 7. 論文目録

本研究は以下に記載した誌上発表の内容を含んだものである。

Sakuma, K., Komatsu, H., Maruyama, M., Imaichi, S., Habata, Y., and Mori, M. (2015). Temporal and spatial transcriptional fingerprints by antipsychotic or propsychotic drugs in mouse brain. *PloS one* *10*, e0118510.

Sakuma, K., Yabuki, C., Maruyama, M., Abiru, A., Komatsu, H., Negoro, N., Tsujihata, Y., Takeuchi, K., Habata, Y., and Mori, M. (2016). Fasiglifam (TAK-875) has dual potentiating mechanisms via Galphaq-GPR40/FFAR1 signaling branches on glucose-dependent insulin secretion. *Pharmacology research & perspectives* *4*, e00237.

## 8. 引用文献

Alam, M.R., Groschner, L.N., Parichatikanond, W., Kuo, L., Bondarenko, A.I., Rost, R., Waldeck-Weiermair, M., Malli, R., and Graier, W.F. (2012). Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake 1 (MICU1) and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter (MCU) contribute to metabolism-secretion coupling in clonal pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry* 287, 34445-34454.

AmericanDiabetesAssociation (2016). 7. Approaches to Glycemic Treatment. *Diabetes care* 39 Suppl 1, S52-59.

Balu, D.T. (2016). The NMDA Receptor and Schizophrenia: From Pathophysiology to Treatment. *Adv Pharmacol* 76, 351-382.

Beazely, M.A., Tong, A., Wei, W.L., Van Tol, H., Sidhu, B., and MacDonald, J.F. (2006). D2-class dopamine receptor inhibition of NMDA currents in prefrontal cortical neurons is platelet-derived growth factor receptor-dependent. *Journal of neurochemistry* 98, 1657-1663.

Berggren, P.O., Yang, S.N., Murakami, M., Efanov, A.M., Uhles, S., Kohler, M., Moede, T., Fernstrom, A., Appelskog, I.B., Aspinwall, C.A., *et al.* (2004). Removal of  $\text{Ca}^{2+}$  channel beta3 subunit enhances  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell* 119, 273-284.

Bergsten, P. (1995). Slow and fast oscillations of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in pancreatic islets correspond to pulsatile insulin release. *The American journal of physiology* 268, E282-287.

Bergsten, P. (2002). Role of oscillations in membrane potential, cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>, and metabolism for plasma insulin oscillations. *Diabetes 51 Suppl 1*, S171-176.

Berridge, M.J. (1997). The AM and FM of calcium signalling. *Nature 386*, 759-760.

Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamales, M., Herve, D., Valjent, E., and Girault, J.A. (2008). Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 28*, 5671-5685.

Boulay, D., Bergis, O., Avenet, P., and Griebel, G. (2010). The glycine transporter-1 inhibitor SSR103800 displays a selective and specific antipsychotic-like profile in normal and transgenic mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 35*, 416-427.

Briscoe, C.P., Tadayyon, M., Andrews, J.L., Benson, W.G., Chambers, J.K., Eilert, M.M., Ellis, C., Elshourbagy, N.A., Goetz, A.S., Minnick, D.T., *et al.* (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *The Journal of biological chemistry 278*, 11303-11311.

Burant, C.F., Viswanathan, P., Marcinak, J., Cao, C., Vakilynejad, M., Xie, B., and Leifke, E. (2012). TAK-875 versus placebo or glimepiride in type 2 diabetes mellitus: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet 379*, 1403-1411.

Clayton, D.F. (2000). The genomic action potential. *Neurobiology of learning and memory 74*, 185-216.

Colsoul, B., Schraenen, A., Lemaire, K., Quintens, R., Van Lommel, L., Segal, A., Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., Margolskee, R.F., *et al.* (2010). Loss of high-frequency glucose-induced  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in *Trpm5*<sup>-/-</sup> mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 5208-5213.

Correll, C.U. (2010). From receptor pharmacology to improved outcomes: individualising the selection, dosing, and switching of antipsychotics. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists* *25 Suppl 2*, S12-21.

Fang, Y., Kenakin, T., and Liu, C. (2015). Editorial: Orphan GPCRs As Emerging Drug Targets. *Frontiers in pharmacology* *6*, 295.

Ferdaoussi, M., Bergeron, V., Zarrouki, B., Kolic, J., Cantley, J., Fielitz, J., Olson, E.N., Prentki, M., Biden, T., MacDonald, P.E., *et al.* (2012). G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. *Diabetologia* *55*, 2682-2692.

Fitchett, D., Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M., Hantel, S., Salsali, A., Johansen, O.E., Woerle, H.J., Broedl, U.C., and Inzucchi, S.E. (2016). Heart failure outcomes with empagliflozin in patients with type 2 diabetes at high cardiovascular risk: results of the EMPA-REG OUTCOME(R) trial. *European heart journal* *37*, 1526-1534.

Flores-Hernandez, J., Cepeda, C., Hernandez-Echeagaray, E., Calvert, C.R., Jokel, E.S., Fienberg, A.A., Greengard, P., and Levine, M.S. (2002). Dopamine enhancement of NMDA

currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32.

Journal of neurophysiology 88, 3010-3020.

Fujiwara, K., Maekawa, F., and Yada, T. (2005). Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca<sup>2+</sup> signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca<sup>2+</sup> channel and link to insulin release. American journal of physiology Endocrinology and metabolism 289, E670-677.

Gilon, P., Chae, H.Y., Rutter, G.A., and Ravier, M.A. (2014). Calcium signaling in pancreatic beta-cells in health and in Type 2 diabetes. Cell calcium 56, 340-361.

Gilon, P., and Henquin, J.C. (2001). Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. Endocrine reviews 22, 565-604.

Gonzalez-Maeso, J., Weisstaub, N.V., Zhou, M., Chan, P., Ivic, L., Ang, R., Lira, A., Bradley-Moore, M., Ge, Y., Zhou, Q., *et al.* (2007). Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. Neuron 53, 439-452.

Gonzalez-Maeso, J., Yuen, T., Ebersole, B.J., Wurbach, E., Lira, A., Zhou, M., Weisstaub, N., Hen, R., Gingrich, J.A., and Sealfon, S.C. (2003). Transcriptome fingerprints distinguish hallucinogenic and nonhallucinogenic 5-hydroxytryptamine 2A receptor agonist effects in mouse somatosensory cortex. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 23, 8836-8843.

Greenberg, M.E., and Ziff, E.B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. Nature 311, 433-438.

Guillozet-Bongaarts, A.L., Hyde, T.M., Dalley, R.A., Hawrylycz, M.J., Henry, A., Hof, P.R., Hohmann, J., Jones, A.R., Kuan, C.L., Royall, J., *et al.* (2014). Altered gene expression in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Molecular psychiatry* 19, 478-485.

Hirose, T., and Kikuchi, T. (2005). Aripiprazole, a novel antipsychotic agent: dopamine D2 receptor partial agonist. *The journal of medical investigation : JMI* 52 *Suppl*, 284-290.

Ikemoto, S. (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain research reviews* 56, 27-78.

Ito, R., Tsujihata, Y., Suzuki, M., Miyawaki, K., Matsuda, K., and Takeuchi, K. (2016). Fasiglifam/TAK-875, a Selective GPR40 Agonist, Improves Hyperglycemia in Rats Unresponsive to Sulfonylureas and Acts Additively with Sulfonylureas. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 357, 217-227.

Ito, T., Hiraoka, S., Kuroda, Y., Ishii, S., Umino, A., Kashiwa, A., Yamamoto, N., Kurumaji, A., and Nishikawa, T. (2007). Effects of schizophrenomimetics on the expression of the CCN1 (CYR 61) gene encoding a matricellular protein in the infant and adult neocortex of the mouse and rat. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 10, 717-725.

Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K.,

Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., *et al.* (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422, 173-176.

Iwakura, T., Fujimoto, S., Kagimoto, S., Inada, A., Kubota, A., Someya, Y., Ihara, Y., Yamada, Y., and Seino, Y. (2000). Sustained enhancement of Ca<sup>2+</sup> influx by glibenclamide induces apoptosis in RINm5F cells. *Biochemical and biophysical research communications* 271, 422-428.

Javitt, D.C., and Zukin, S.R. (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 148, 1301-1308.

Kaku, K., Enya, K., Nakaya, R., Ohira, T., and Matsuno, R. (2015). Efficacy and safety of fasiglifam (TAK-875), a G protein-coupled receptor 40 agonist, in Japanese patients with type 2 diabetes inadequately controlled by diet and exercise: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Diabetes, obesity & metabolism* 17, 675-681.

Kantrowitz, J., and Javitt, D.C. (2012). Glutamatergic transmission in schizophrenia: from basic research to clinical practice. *Current opinion in psychiatry* 25, 96-102.

Keshavan, M.S., Lawler, A.N., Nasrallah, H.A., and Tandon, R. (2016). New drug developments in psychosis: Challenges, opportunities and strategies. *Progress in neurobiology*.

Komatsu, H. (2015). Novel Therapeutic GPCRs for Psychiatric Disorders. *International journal of molecular sciences* 16, 14109-14121.

Komatsu, H., Maruyama, M., Yao, S., Shinohara, T., Sakuma, K., Imaichi, S., Chikatsu, T.,

Kuniyeda, K., Siu, F.K., Peng, L.S., *et al.* (2014). Anatomical transcriptome of G protein-coupled receptors leads to the identification of a novel therapeutic candidate GPR52 for psychiatric disorders. *PloS one* 9, e90134.

Kong, K.C., Butcher, A.J., McWilliams, P., Jones, D., Wess, J., Hamdan, F.F., Werry, T., Rosethorne, E.M., Charlton, S.J., Munson, S.E., *et al.* (2010). M3-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of protein kinase D1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 21181-21186.

Kristinsson, H., Bergsten, P., and Sargsyan, E. (2015). Free fatty acid receptor 1 (FFAR1/GPR40) signaling affects insulin secretion by enhancing mitochondrial respiration during palmitate exposure. *Biochimica et biophysica acta* 1853, 3248-3257.

Krystal, J.H., Karper, L.P., Seibyl, J.P., Freeman, G.K., Delaney, R., Bremner, J.D., Heninger, G.R., Bowers, M.B., Jr., and Charney, D.S. (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of general psychiatry* 51, 199-214.

Laruelle, M., Frankle, W.G., Narendran, R., Kegeles, L.S., and Abi-Dargham, A. (2005). Mechanism of action of antipsychotic drugs: from dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonism to glutamate NMDA facilitation. *Clinical therapeutics* 27 *Suppl A*, S16-24.

Leucht, S., Corves, C., Arbter, D., Engel, R.R., Li, C., and Davis, J.M. (2009). Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a

meta-analysis. *Lancet* 373, 31-41.

Liu, Y.J., Tengholm, A., Grapengiesser, E., Hellman, B., and Gylfe, E. (1998). Origin of slow and fast oscillations of  $Ca^{2+}$  in mouse pancreatic islets. *The Journal of physiology* 508 ( Pt 2), 471-481.

Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A., and Worley, P.F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14, 433-445.

Ma, M., Ren, Q., Fujita, Y., Ishima, T., Zhang, J.C., and Hashimoto, K. (2013). Effects of AS2586114, a soluble epoxide hydrolase inhibitor, on hyperlocomotion and prepulse inhibition deficits in mice after administration of phencyclidine. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 110, 98-103.

MacDonald, P.E., and Rorsman, P. (2006). Oscillations, intercellular coupling, and insulin secretion in pancreatic beta cells. *PLoS biology* 4, e49.

Maedler, K., Carr, R.D., Bosco, D., Zuellig, R.A., Berney, T., and Donath, M.Y. (2005). Sulfonylurea induced beta-cell apoptosis in cultured human islets. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90, 501-506.

Manago, F., Mereu, M., Mastwal, S., Mastrogiacomo, R., Scheggia, D., Emanuele, M., De Luca, M.A., Weinberger, D.R., Wang, K.H., and Papaleo, F. (2016). Genetic Disruption of Arc/Arg3.1 in Mice Causes Alterations in Dopamine and Neurobehavioral Phenotypes

Related to Schizophrenia. Cell reports.

Mancini, A.D., Bertrand, G., Vivot, K., Carpentier, E., Tremblay, C., Ghislain, J., Bouvier, M., and Poitout, V. (2015). beta-Arrestin Recruitment and Biased Agonism at Free Fatty Acid Receptor 1. *The Journal of biological chemistry* 290, 21131-21140.

Mancini, A.D., and Poitout, V. (2015). GPR40 agonists for the treatment of type 2 diabetes: life after 'TAKing' a hit. *Diabetes, obesity & metabolism* 17, 622-629.

Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., and Yamamura, K. (1990). Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127, 126-132.

Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., and Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237, 192-197.

Negoro, N., Sasaki, S., Mikami, S., Ito, M., Suzuki, M., Tsujihata, Y., Ito, R., Harada, A., Takeuchi, K., Suzuki, N., *et al.* (2010). Discovery of TAK-875: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable GPR40 Agonist. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 1, 290-294.

Negoro, N., Sasaki, S., Mikami, S., Ito, M., Tsujihata, Y., Ito, R., Suzuki, M., Takeuchi, K., Suzuki, N., Miyazaki, J., *et al.* (2012). Optimization of (2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl)acetic acids: discovery of a non-free fatty acid-like, highly bioavailable G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 agonist as a glucose-dependent insulinotropic agent. *Journal of medicinal chemistry* 55, 3960-3974.

Okuno, H. (2011). Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neuroscience research* 69, 175-186.

Okuno, H., Akashi, K., Ishii, Y., Yagishita-Kyo, N., Suzuki, K., Nonaka, M., Kawashima, T., Fujii, H., Takemoto-Kimura, S., Abe, M., *et al.* (2012). Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKIIbeta. *Cell* 149, 886-898.

Panenka, W.J., Procyshyn, R.M., Lecomte, T., MacEwan, G.W., Flynn, S.W., Honer, W.G., and Barr, A.M. (2013). Methamphetamine use: a comprehensive review of molecular, preclinical and clinical findings. *Drug and alcohol dependence* 129, 167-179.

Paxinos, G., and Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (4th edition): San Diego: Academic Press.

Rask-Andersen, M., Almen, M.S., and Schioth, H.B. (2011). Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nature reviews Drug discovery* 10, 579-590.

Robbins, M.J., Critchlow, H.M., Lloyd, A., Cilia, J., Clarke, J.D., Bond, B., Jones, D.N., and Maycox, P.R. (2008). Differential expression of IEG mRNA in rat brain following acute treatment with clozapine or haloperidol: a semi-quantitative RT-PCR study. *Journal of psychopharmacology* 22, 536-542.

Rorsman, P., and Braun, M. (2013). Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annual review of physiology* 75, 155-179.

Roth, B.L., Sheffler, D.J., and Kroeze, W.K. (2004). Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nature reviews Drug*

discovery 3, 353-359.

Smedler, E., and Uhlen, P. (2014). Frequency decoding of calcium oscillations. *Biochimica et biophysica acta* 1840, 964-969.

Srivastava, A., Yano, J., Hirozane, Y., Kefala, G., Gruswitz, F., Snell, G., Lane, W., Ivetac, A., Aertgeerts, K., Nguyen, J., *et al.* (2014). High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875. *Nature* 513, 124-127.

Tsujihata, Y., Ito, R., Suzuki, M., Harada, A., Negoro, N., Yasuma, T., Momose, Y., and Takeuchi, K. (2011). TAK-875, an orally available G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 agonist, enhances glucose-dependent insulin secretion and improves both postprandial and fasting hyperglycemia in type 2 diabetic rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 339, 228-237.

Uhlen, P. (2004). Spectral analysis of calcium oscillations. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004, p115.

Wood, S., Sage, J.R., Shuman, T., and Anagnostaras, S.G. (2014). Psychostimulants and cognition: a continuum of behavioral and cognitive activation. *Pharmacological reviews* 66, 193-221.

Yabuki, C., Komatsu, H., Tsujihata, Y., Maeda, R., Ito, R., Matsuda-Nagasumi, K., Sakuma, K., Miyawaki, K., Kikuchi, N., Takeuchi, K., *et al.* (2013). A novel antidiabetic drug, fasiglifam/TAK-875, acts as an ago-allosteric modulator of FFAR1. *PloS one* 8, e76280.

Yamada, K., Gerber, D.J., Iwayama, Y., Ohnishi, T., Ohba, H., Toyota, T., Aruga, J., Minabe,

Y., Tonegawa, S., and Yoshikawa, T. (2007). Genetic analysis of the calcineurin pathway identifies members of the EGR gene family, specifically EGR3, as potential susceptibility candidates in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 2815-2820.

Yang, M., Chisholm, J.W., Soelaiman, S., and Shryock, J.C. (2010). Sulfonylureas uncouple glucose-dependence for GPR40-mediated enhancement of insulin secretion from INS-1E cells. *Molecular and cellular endocrinology* *315*, 308-313.

Yedovitzky, M., Mochly-Rosen, D., Johnson, J.A., Gray, M.O., Ron, D., Abramovitch, E., Cerasi, E., and Nesher, R. (1997). Translocation inhibitors define specificity of protein kinase C isoenzymes in pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry* *272*, 1417-1420.

Yui, K., Ikemoto, S., Ishiguro, T., and Goto, K. (2000). Studies of amphetamine or methamphetamine psychosis in Japan: relation of methamphetamine psychosis to schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences* *914*, 1-12.

Zarrindast, M.R., Misaghi, S., and Ahmadi, S. (2008). The dopaminergic system plays a role in the effect of lithium on inhibitory avoidance memory in mice. *European journal of pharmacology* *590*, 198-203.

Zarrindast, M.R., and Rezayof, A. (2004). Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *European journal of pharmacology* *497*, 197-204.

Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M.,

Devins, T., Johansen, O.E., Woerle, H.J., *et al.* (2015). Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* 373, 2117-2128.

## 9. 謝辞

本研究をまとめるに際し終始懇篤なる御指導並びに御高閲を賜りました恩師、東京大学大学院薬学系研究科 堅田 利明 教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり惜しめない御指導と激励を頂きました武田薬品工業株式会社医薬研究本部 中枢疾患創薬ユニット主任研究員 小松 秀俊 博士、循環代謝創薬ユニット主任研究員 丸山 穰 博士、同主席研究員 辻畑 善行 博士、同リサーチマネージャー 武内 浩二 マネージャー、同主席研究員 羽畑 祐吾 博士、同リサーチマネージャー 森 正明 博士に厚く御礼申し上げます。また本研究はアライアンスグループ 矢吹 千織 課長代理、基盤技術研究所 今市 祥子 研究員、循環代謝創薬ユニット 阿比留 晶子 研究員、免疫ユニット主席研究員 根来 伸行 博士の御協力と御援助を頂き完成されたものであり深謝いたします。本研究の機会を与えて頂いた医薬研究本部長 丸山 哲行 博士、先端科学研究所所長 長屋 秀明 博士、また適切な御配慮と御鞭撻を賜った循環代謝創薬ユニット長 出雲 正剛 博士、同副ユニット長 山田 幸男 博士、同リサーチマネージャー 野田 昌邦 博士、同主席研究員 池田 正太 博士に深厚なる謝意を示します。

最後にこれまでの研究生活を共にし終始御協力と激励を頂いた同僚諸氏並びに、東京慈恵会医科大学 熱帯医学講座 助教 佐久間 知佐子 博士を始めとする家族に心から感謝申し上げます。