

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 佐久間 健介

【序論】

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は様々な疾患領域における重要な薬剤標的のクラスであり、上市薬の約 30% が GPCR を標的とする。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。同疾患に対する創薬は Gai/o 共役型 GPCR のドパミン D2 受容体 (D2R) 遮断作用を持ち代表的な 3 症状 (陽性・陰性・認知機能低下) のうち陽性症状に著効する第 1 世代の定型薬から始まった。その後 5-HT₂ 受容体等、他の神経伝達物質受容体への親和性を持たせ陰性症状改善を狙った Multi-Acting Receptor Target Antipsychotics、D2R 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 など様々な薬剤が創製され、第 2, 3 世代の非定型薬と呼ばれてきた。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評価するのは困難であった。そこでそれらを包括的に評価しうる新しい指標として最初期遺伝子群 (IEGs) に着目した。IEGs はシグナル伝達の下流で神経可塑性や記憶に繋がる最も初期の応答を起こす遺伝子群を指す。統合失調症の既存薬や精神刺激薬をマウスに投与した時に脳の各部位で IEGs が示す発現変動パターンを解析し、症状発症に至る可塑的变化の早期マーカーとなる IEGs や治療薬に特徴的な転写調節プロファイルが同定できないか検討を行った。

他方、武田薬品工業で創製されたファシグリファミンは、中鎖鎖脂肪酸をリガンドとする Gαq 共役型 GPCR の GPR40 に対するアロステリック様作動薬である。GPR40 は膵臓の β 細胞に高発現しその活性化で下流の細胞内 Ca²⁺ 上昇を介してインスリン分泌が促進されることから、新しいインスリン分泌促進薬のメカニズムとして注目されてきた。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、これは既存薬の副作用である低血糖リスク回避に繋がる。実際の臨床試験において同剤は SU 剤と同等の血糖降下作用を示す一方で、SU 剤で高い低血糖発現率は対照群と同等に低いという成績が得られ、ヒトでメカニズムの有効性を証明した。このような特性にも関わらず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は臨床後期に至るまで不明であった。そこで本研究では、グルコース依存性インスリン分泌 (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、同剤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。

【本論】

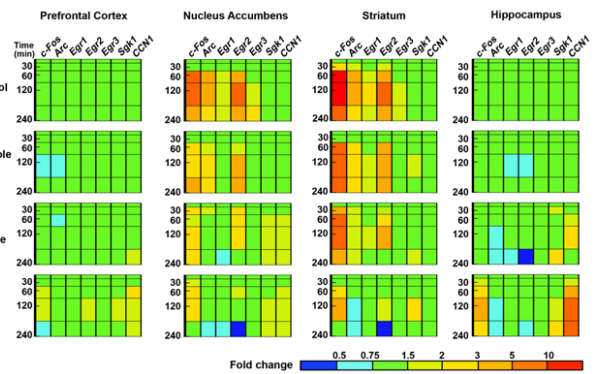
1. GPCR を標的とする統合失調症治療薬に対する新しい評価系の構築

1-1. 既存薬投与は側坐核、線条体を中心に一過性の IEGs 発現上昇をもたらす

第 1～第 3 世代を代表する、定型薬のハロペリドール、非定型薬のオランザピン、アリピプラゾール、クロザピンは様々な GPCR に対する阻害活性を有し薬理学的特性が異なる。まず初めにこれらを投与した際のマウス脳における IEGs 発現変動タイムコースを qRT-PCR 法で検討した。検討は統合失調症の病態形成に重要な 4 部位、認知機能や記憶に関与する前頭前野と海馬、運動機能を司る線条体、情動を司る側坐核で行った。疾患との関連性が高い IEGs として、神経活動マーカーに広く用いられる *c-fos*、患者の前頭

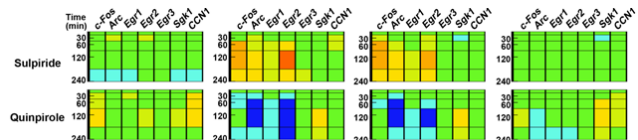
薬で発現低下が報告され、シナプス可塑性や記憶に関与する *Arc*、同じく死後脳解析で発現低下が認められ SNPs 解析から同症の脆弱性因子と考えられた *Egr1*, *Egr2*, *Egr3*、クロザピンや精神刺激薬による発現誘導が報告される *Sgk1*, *Ccn1* の 7 つに着目した。

薬剤投与 4 時間後までのサンプルを採集し mRNA の発現レベルを測定した。いずれの薬剤投与群でも 1~2 時間に発現上昇のピークがあり 4 時間にかけて収束した。ハロペリドール、アリピプラゾール、オランザピンの 3 剤は共通して側坐核と線条体で *c-fos*, *Arc*, *Egr2* の発現上昇をもたらした。一方クロザピンはそれらと異なり全 4 部位で *c-fos*, *Sgk1*, *Ccn1* を誘導した。すなわち他剤とは異なる転写調節機構で薬効をもたらす可能性を示唆した。



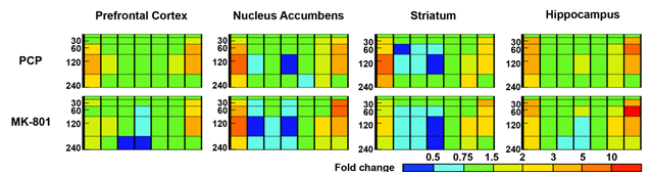
1-2. D2R 選択的薬剤による発現変動との比較

類似性の高い発現パターンを示した 3 剤はいずれも D2R への高い結合活性を持つことから、D2R 選択的薬剤を投与した際のパターンを調べ比較した。その結果、D2R 遮断薬スルピリドは前述の 3 剤と同じ発現上昇パターンを示す一方で D2R 作動薬キンピロールは低下をもたらした。すなわち側坐核及び線条体における *c-fos*, *Arc*, *Egr2* の発現誘導は D2R シグナル遮断の特徴を強く反映したものと推察された。



1-3. NMDA 受容体遮断薬による発現変動との比較

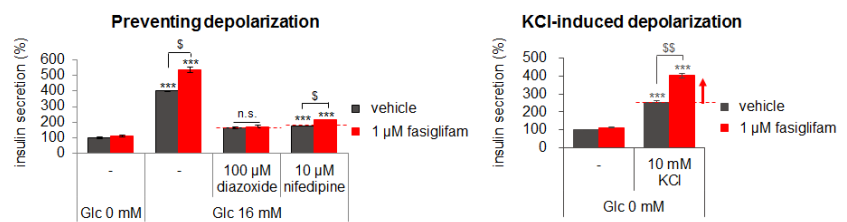
NMDA 受容体はイオンチャネル型のグルタミン酸受容体であり、グルタミン酸の神経伝達不全は統合失調症の一因とされる。NMDA 受容体遮断薬はヒトで陽性・陰性症状を引き起こし、既存薬は陰性症状に効果不十分であることから同症状を狙った薬剤誘発モデルに広く用いられてきた。そこで同遮断薬投与による変動パターンを調べたところ、D2R 作動薬と類似の側坐核と線条体における *Arc*, *Egr2* の発現低下を認めた。1-2. の結果と併せて D2R シグナル遮断あるいは NMDA 電流活性化による *Arc*, *Egr2* の発現上昇が薬効に繋がる遺伝子マーカー候補と考えられた。



2. 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

2-1. 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 GSIS は、細胞内に取り込まれたグルコースが代謝され ATP を産生、ATP 感受性 K⁺ チャンネルが閉じて細胞膜が脱分極し、電位依存性 Ca²⁺ チャンネルが開いて Ca²⁺ が流入しインスリン分泌顆粒の放出を促進するという一連の機構で生じる。まずファシグリファムの作用発揮における脱分極の必要性を検討した。高グルコース下で発揮される同剤のインスリン分泌促進作用は、ATP 感



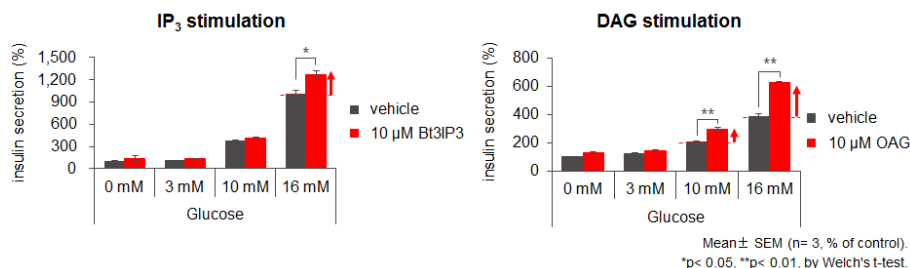
Mean ± SEM (n = 3, % of control).
***p < 0.001 by Dunnett's test.
SSp < 0.01, Sp < 0.05 by Welch's t-test.

受性 K^+ チャネル開口薬ジアゾキシド、電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害剤ニフェジピンで殆ど消失した。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同剤は作用を示さないが、古典的な脱分極剤の KCl 刺激で脱分極・インスリン分泌を起こすと同剤の促進作用が発揮された。以上よりグルコースの代謝等で生じる細胞膜の脱分極が同剤の作用発揮に必須と考えられた。

2-2. GPR40 下流の IP_3/Ca^{2+} , DAG/PKC 両経路がインスリン分泌促進作用に寄与する

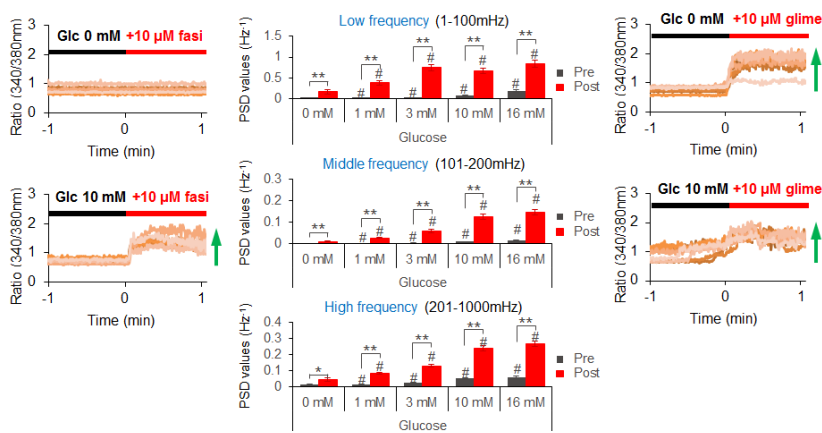
次に、GPR40/Gaq 下流のセカンドメッセンジャーである IP_3 と DAG の膜透過性アナログを用いてファシグリファムのインスリン分泌促進作用における両経路の寄与を検討した。いずれのアナログを添加した場合でもファシグリファムと

同様、グルコース濃度依存的なインスリン分泌増強作用がみられたことから両経路共に作用に寄与すると考えられた。



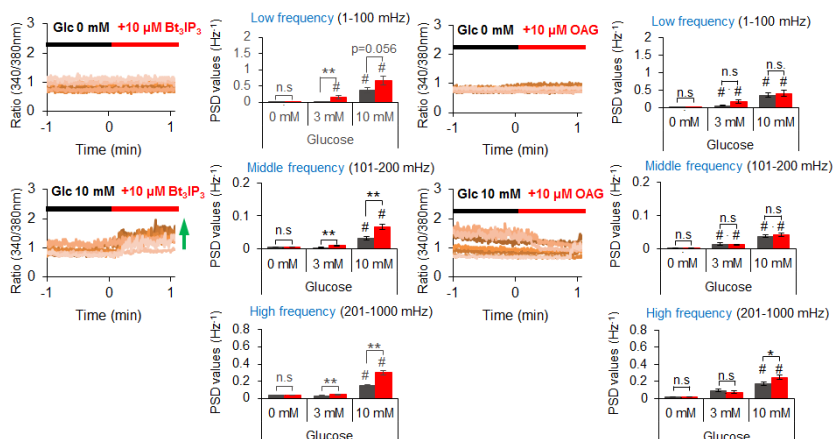
2-3. ファシグリファムはグルコース濃度依存的に Ca^{2+} オシレーションの振幅を上昇させる

膵β細胞におけるインスリン分泌には周期性があり、細胞質における Ca^{2+} オシレーションが重要と言われる。 Ca^{2+} オシレーションは効率的な転写活性化や他の細胞内小器官への波及を通じた代謝活性化といった生理的意義を持つ。そこでファシグリファム添加が Ca^{2+} オシレーションに与える影響を検討した。細胞内 Ca^{2+} 指示薬 Fura2-AM を用いて各グルコース濃度における Ca^{2+} オシレーションを検出し同剤添加による変化を比較した。得られた波形に対して高速フーリエ変換を行い振幅および周波数特性を調べた。すると、刺激が特定の周波数成分にのみ影響を及ぼすことはなかったが、全ての周波数帯でグルコース濃度依存的に波の強度が上昇した。なお SU 剤のグリメピリドはインスリン分泌同様、グルコース濃度と無関係に Ca^{2+} 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。



2-4. GPR40 下流の IP_3 刺激はグルコース濃度に応じて Ca^{2+} オシレーションを増強し DAG 刺激は殆ど影響を与えない

続いて GPR40 下流シグナル活性化による Ca^{2+} オシレーションへの影響を調べた。 IP_3 刺激はファシグリファム同様 Ca^{2+} 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 刺激は Ca^{2+} オシレーションに殆ど影響を与えなかったことから、DAG/PKC 経路は Ca^{2+} オシレーション



ンとまた別の機序でインスリン分泌促進に寄与すると考えられた。

2-5. DAG/PKC 経路は電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを通じた Ca^{2+} 流入と相乗的にインスリン分泌を促進する

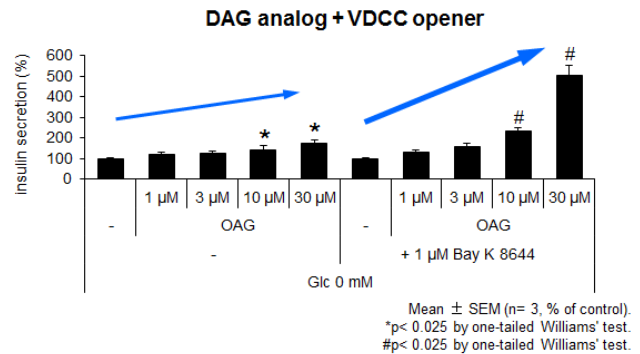
そこで DAG/PKC 経路と Ca^{2+} ダイナミクスの相互作用を調べた。グルコース非存在下で DAG 刺激は濃度依存的な若干のインスリン分泌促進を示した。ここに電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの開口薬 Bay K 8644 を共存させ、細胞外からの Ca^{2+} 流入を起こすと相乗的なインスリン分泌が引き起こされた。よって PKC はおそらく下流の分泌顆粒や細胞骨格への作用によって Ca^{2+} ダイナミクスと相乗的にインスリン分泌促進に寄与すると考えられた。

【結語】

本研究で私は以下の2点を明らかにした。

1. 様々な GPCR を標的とする統合失調症の既存薬や精神刺激薬は下流でその薬理学的特徴や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、疾患関連部位の IEGs 発現プロファイルに着目した *in vivo* スクリーニングは有効な薬剤探索手法と考えられた。

2. GPR40 作動薬ファシグリファムの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_3/Ca^{2+} 放出経路による Ca^{2+} オシレーションの増強、(2) DAG/PKC 経路による Ca^{2+} 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。



1. について、従来広く用いられてきた *c-fos* だけでなく今回示した *Arc* や *Egr2* を含めた複数の IEGs に着目することで包括的な薬剤評価が出来る可能性を示した。今後はより陰性症状や認知機能改善を期待させる IEGs サブセットの同定に繋げたい。

2. について、このようなメカニズムが SU 剤や他の Gas 共役型 GPCR 標的薬とは異なる、安全な血糖低下作用をもたらすと考えられた。同剤は肝毒性の懸念から臨床第3相試験で開発中止となったが GPR40 作動薬のコンセプトは引き続き多くのチームに支持されており患者さんに安全な血糖コントロールを提供できる新薬が今後届けられることを期待したい。

