

GPCR を標的とした新規薬剤開発のための薬理学的研究

桜井 卓

目次

略語一覧

| | |
|--|----|
| 序論 | 1 |
| 第一章 GPR81 作動薬の探索及びリード化合物の薬理的解析 | 15 |
| 1-1 緒言 | 15 |
| 1-2 結果 | 17 |
| 1-2-1) GPR81 作動薬の探索 | 17 |
| 1-2-2) GPR81 に対する選択性評価 | 17 |
| 1-2-3) 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪分解抑制作用 | 23 |
| 1-2-4) <i>in vivo</i> における薬効評価と皮膚紅潮作用 | 24 |
| 1-3 まとめと考察 | 27 |
| 1-4 実験方法 | 29 |
| 第二章 MCHR1 拮抗薬 MQ1 の阻害様式に関する研究 | 32 |
| 2-1 緒言 | 32 |
| 2-2 結果 | 34 |
| 2-2-1) MQ1 が MCHR1 の各種シグナル経路に与える影響 | 34 |
| 2-2-2) MQ1 の時間依存的な阻害作用 | 34 |
| 2-2-3) MQ1 の可逆性評価 | 38 |
| 2-2-4) MQ1 の阻害作用にウォッシュアウトが与える影響 | 42 |
| 2-2-5) MQ1 の速度論的解析 | 42 |
| 2-2-6) MQ1 の阻害様式 | 42 |
| 2-2-7) [¹²⁵ I]MCH-(4-19) と MCHR1 の相互作用に MQ1 が与える影響 | 45 |
| 2-2-8) 変異導入による結合部位の推定 | 53 |
| 2-2-9) MQ1 の選択性 | 53 |
| 2-3 まとめと考察 | 56 |
| 2-4 実験方法 | 61 |
| 第三章 MT ₂ メラトニン受容体選択的部分作動薬の薬理的解析 | 65 |
| 3-1 緒言 | 65 |
| 3-2 結果 | 69 |
| 3-2-1) IF1 の結合プロフィール | 69 |
| 3-2-2) MT ₂ 受容体に対する IF1 の作動活性 | 71 |

| | |
|--|-----|
| 3-2-3) IF1 による MT ₂ 受容体のインターナリゼーション | 71 |
| 3-2-4) β-アレスチンシグナル経路と受容体インターナリゼーション強度の関係 | 76 |
| 3-2-5) 他のシグナル経路のインターナリゼーションへの関与の検証 | 78 |
| 3-3 まとめと考察 | 80 |
| 3-4 実験方法 | 84 |
| | |
| 総括 | 87 |
| | |
| 参考文献 | 92 |
| | |
| 論文目録 | 105 |
| | |
| 謝辞 | 106 |

略語一覽

| | |
|-------|--|
| ASMS | Affinity Selection Mass Spectrometry |
| ATP | adenosine triphosphate |
| Ava | aminovaleric acid |
| BSA | bovine serum albumin |
| cAMP | cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate |
| CHAPS | 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonic acid |
| CHO | Chinese hamster ovary |
| CRF1R | corticotrophin-releasing factor receptor 1 |
| dFBS | dialyzed Fetal Bovine Serum |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| FCIII | Fetal Clone III |
| GDP | guanosine diphosphate |
| GPCR | G-protein coupled receptor |
| GRK | G protein-coupled receptor kinase |
| GTP | guanosine triphosphate |
| Gva | 5-guanidinovaleric acid |
| HBSS | Hanks' balanced buffered saline |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| HTRF | homogenous time-resolved fluorescence |
| HTS | high-throughput screening |
| LC/MS | Liquid Chromatography/Mass Spectrometry |
| MCH | Melanin Concentrating Hormone |
| MCHR1 | Melanin Concentrating Hormone Receptor 1 |
| PPAR | peroxisome proliferator-activated receptor |
| PTX | pertussis toxin |
| RGS | regulator of G protein-signaling |
| RhoA | Ras homolog gene family, member A |
| ROCK | Rho-associated protein kinase |
| SLC-1 | somatostatin-like receptor 1 |

序論

1. 細胞情報伝達と GPCR

細胞は生物体の構造及び機能上の基本単位であり、個々の細胞が互いにネットワークを作り様々な機能を発揮することで生命活動を支えている。生体が多様な環境下でホメオスタシスを維持し健全な生命活動を営むためには、外界からの情報に的確に応答し、一群の細胞集団が組織または臓器として機能することが必須である。こうした細胞間の相互作用を制御する機構は、細胞情報伝達機構と呼ばれ、この機構が各種生理や組織でダイナミックに作動することで個体の活動が可能となる。生体に備わっている細胞情報伝達機構には、神経系、内分泌系、免疫系、感覚受容器系などが知られている。いずれの反応系においても、細胞は外界からの信号を認識し、細胞内に生理反応を惹起することで情報を伝えており、この反応の制御を主に司っているのが細胞膜受容体である。細胞膜受容体はその構造や機能によって、7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体(GPCR)、1回膜貫通型の細胞増殖因子型受容体(チロシンキナーゼ型受容体)、イオンチャネル内蔵型受容体の3種類に分類される(図0-1)。

その中でも GPCR はヒトゲノムにおいて 800 種類以上存在するとされ、非常に大きなスーパーファミリーを形成している(1)。GPCR の特徴の一つは、無機及び有機イオン、金属、アミン、脂質、ペプチド、核酸、味や匂いなど多様な分子種をリガンドとして認識することで、極めて広範囲のシグナル及び細胞機能制御に関与していることである。従って GPCR を介したシグナル伝達機構の解明は、生命現象の基礎や病態生理の理解とその合理的な治療法創出のために極めて重要である。

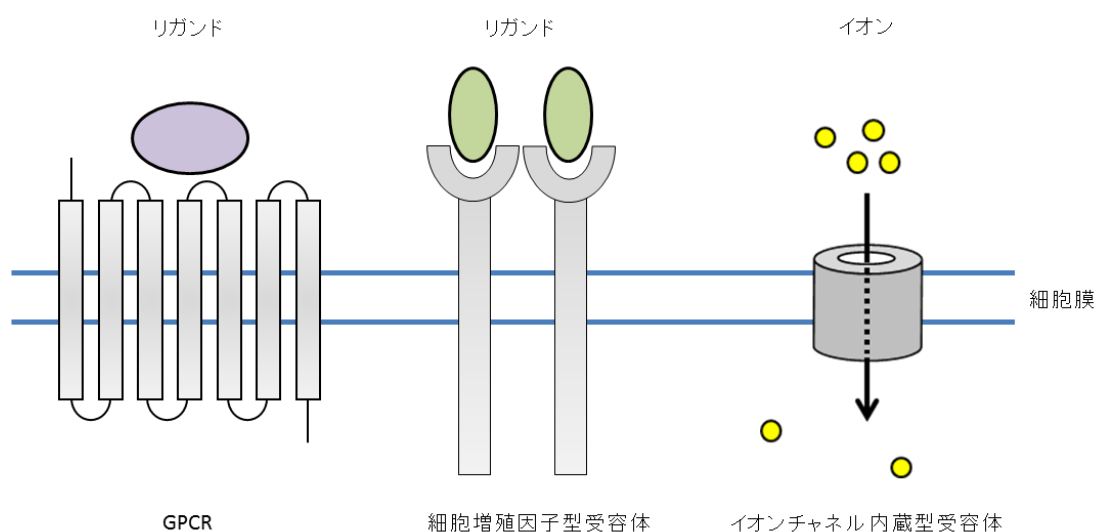


図0-1 細胞膜受容体の構造

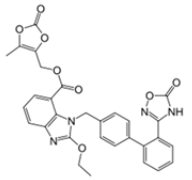
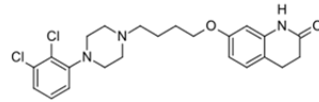
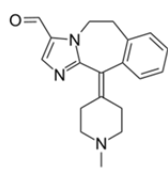
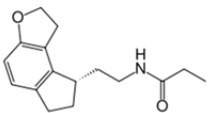
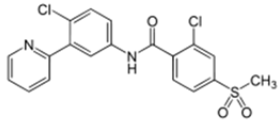
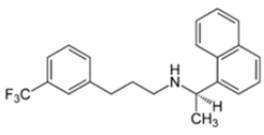
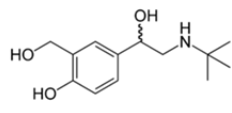
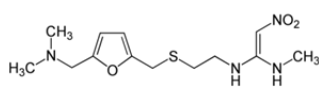
特に GPCR は医薬品の標的分子としても歴史的に重要である。現在臨床で使われている医薬品化合物の標的分子はおよそ 500 種類程度とされ、その約半数は GPCR である。また、医薬品化合物の種類はおよそ 1400 種類とされ、その約 30%は GPCR に作用していると考えられている。更にその治療対象も高血圧、統合失調症、アレルギー、偏頭痛、喘息、消化性潰瘍、癌、不安症など多岐に渡っている。表 0-1 に GPCR を標的とした代表的な医薬品を示した(2-4)。また、2010 年から 2012 年の 3 年間にアメリカ食品医薬品局(FDA)に承認された新規医薬品化合物の内訳を見ても、90 品目中 17 品目(19%)が GPCR を標的としており、依然として重要な創薬標的であることが伺える(5)。

2. GPCR の情報伝達機構

GPCR を介した情報伝達は、リガンドの結合により活性化された GPCR が、細胞内でのセカンドメッセンジャー(二次情報伝達物質)産生を介在し、そのセカンドメッセンジャーが種々のエフェクター分子に作用することでなされる。GPCR 情報伝達の代表的なセカンドメッセンジャーとしては cAMP (cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate), Ca^{2+} イオン, イノシトール三リン酸(IP_3)などがあり、この情報伝達を仲介する物質が G タンパク質(GTP 結合タンパク質)である。G タンパク質は、 α 、 β 、 γ と呼ばれる異なる 3 つのサブユニットから構成され、 $G\alpha$ サブユニットは GDP (guanosine diphosphate)または GTP (guanosine triphosphate)との結合能を有している。 β 及び γ サブユニットは互いに固く結合しており、 $G\beta\gamma$ 複合体と呼ばれるヘテロダイマーを形成している。通常、G タンパク質は GDP と結合した不活性化状態で細胞膜に存在している[図 0-2 (a)]。GPCR がリガンドによって活性化されると、G タンパク質-GDP 複合体は GPCR と結合し、G タンパク質に結合している GDP は GTP に変換される[(図 0-2 (b))。その後、G タンパク質の α サブユニットは $G\beta\gamma$ 複合体から解離し、後述するアデニル酸シクラーゼやホスホリパーゼ C (PLC)などの種々のエフェクター分子に作用する[(図 0-2 (c))。 $G\alpha$ サブユニットに結合した GTP は、 $G\alpha$ サブユニットに内在する GTPase 活性によって GDP へと分解され[(図 0-2 (d))、その後再び $G\beta\gamma$ 複合体と結合した不活性化状態へと戻る[(図 0-2 (a))。この様に G タンパク質はリサイクルされるため、リガンドにより活性化された各 GPCR は何度もシグナルを伝達することが可能となり、シグナルを増幅することができる。これによりわずかな刺激から大きな反応を惹起することが可能となる。

GPCR と共役する $G\alpha$ サブユニットは、現在までに少なくとも 20 種類が報告されており、その機能によって $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$ 及び $G\alpha_{12}$ の 4 種類のファミリーに分類される(6) (表 0-2)。 $G\alpha_s$ ファミリーは $G\alpha_s$ 及び $G\alpha_{olf}$ サブユニットから構成され、細胞膜に存在するアデニル酸シクラーゼを活性化し、ATP (adenosine triphosphate)から cAMP の産生を引き起こす。これに対し、 $G\alpha_{i1-3}$ 、 $G\alpha_{o1-2}$ 、 $G\alpha_{t1-2}$ 及び $G\alpha_{gust}$ のサブユニットから構成される $G\alpha_i$ ファミリーはアデニル酸シクラーゼの酵素活性を阻害し、cAMP 量を抑制する作用を持つ(6)。 $G\alpha_q$ ファミリーは、 $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{11}$ 、 $G\alpha_{14}$ 、 $G\alpha_{15}$ 及び $G\alpha_{16}$ サブユニットから構成され、PLC を活性化

表 0-1 GPCR を標的とした代表的な医薬品

| 一般名 (商品名) | 標的GPCRと分子メカニズム | 治療対象 | 構造式 | 承認(年) |
|-------------------------|-----------------------------|-----------|--|-------|
| Azilsartan (Edarbi) | アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 | 高血圧 |  | 2011 |
| Aripiprazole (Abilify) | ドパミン受容体部分作動薬 | 統合失調症 |  | 2006 |
| Alcaftadine (Lastacast) | ヒスタミンH ₁ 受容体拮抗薬 | アレルギー性結膜炎 |  | 2010 |
| Ramelteon (Rozerem) | メラトニン受容体作動薬 | 睡眠障害 |  | 2010 |
| Vismodegib (Erivedge) | SMO受容体拮抗薬 | 基底細胞癌 |  | 2012 |
| Cinacalcet (Sensipar) | カルシウム感知受容体アロステリック作動薬 | 副甲状腺機能亢進症 |  | 2004 |
| Salbutamol (Ventolin) | B ₂ アドレナリン受容体作動薬 | 喘息 |  | 1969 |
| Ranitidine (Zantac) | ヒスタミンH ₂ 受容体拮抗薬 | 胃酸分泌 |  | 1981 |

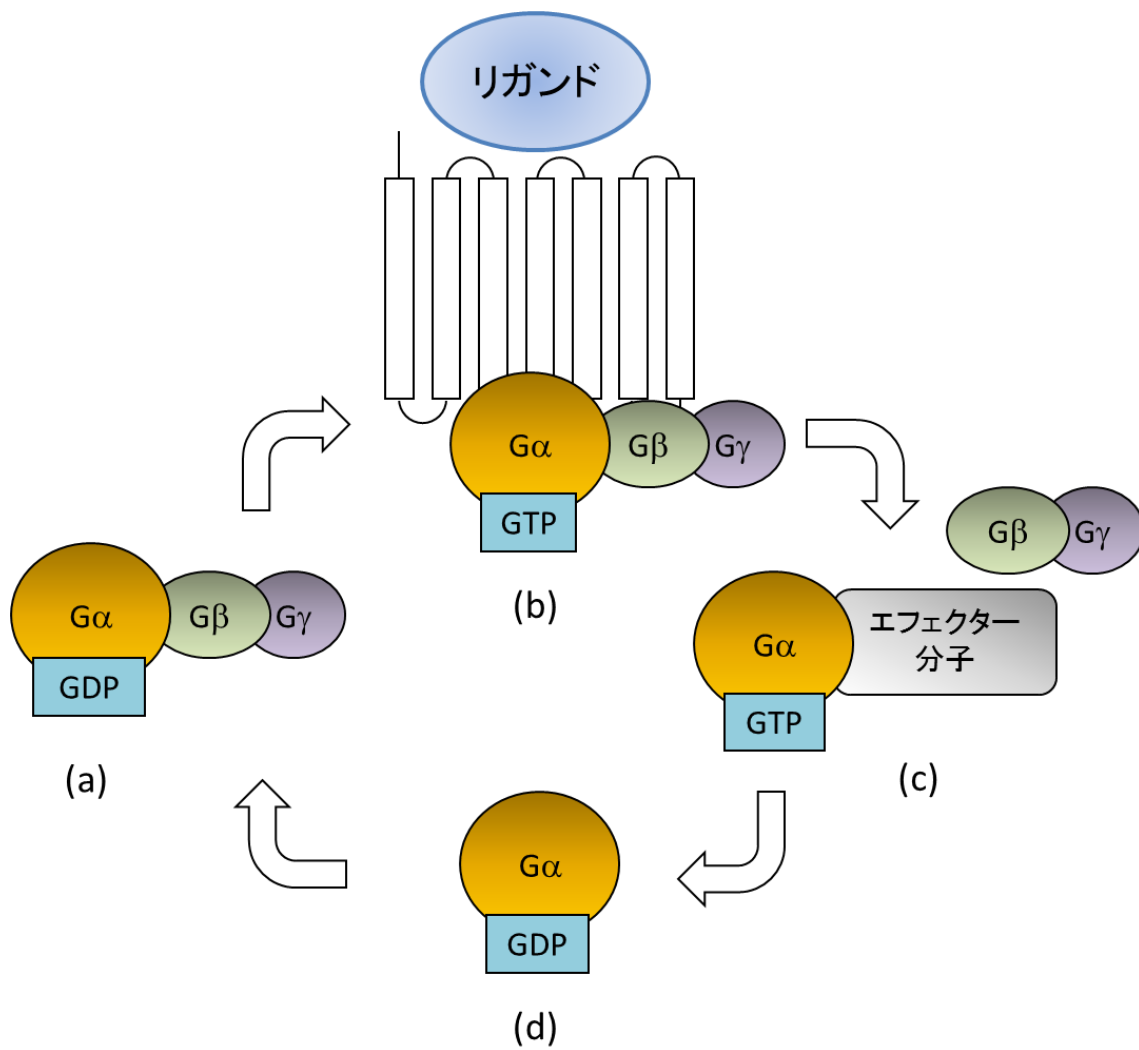


図 0-2 GPCR の活性化機構

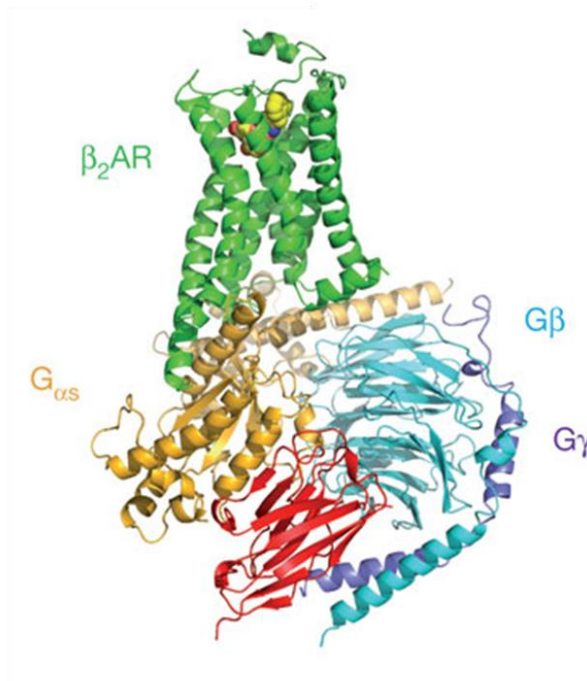
表 0-2 G α タンパク質の分類

| ファミリー | サブユニット | 発現 | 機能 |
|-----------------|--------------------------------|---------|-------------------|
| G α_s | G α_s | 偏在 | アデニル酸シクラーゼ 活性化 |
| | G α_{olf} | 嗅細胞 | |
| G α_i | G α_{i1-3} | 偏在 | アデニル酸シクラーゼ 抑制 |
| | G α_{o1-2} | 脳、神経組織 | |
| | G α_{t1-2} | 網膜 | |
| | G α_{gust} | 味蕾 | |
| G α_q | G α_q , G α_{11} | 偏在 | ホスホリパーゼC 活性化 |
| | G α_{14} | 肺、腎臓、肝臓 | |
| | G α_{15} | T 細胞 | |
| | G α_{16} | B 細胞 | |
| G α_{12} | G α_{12} | 偏在 | GTPase RhoA活性化 |
| | G α_{13} | | |

し、これによりホスファチジルイノシトール(4,5)-二リン酸が IP_3 とジアシルグリセロールに分解される(7)。 IP_3 は小胞体顆粒に存在する IP_3 受容体を活性化し、小胞体内に蓄えられている Ca^{2+} イオンを細胞質に放出させる一方、ジアシルグリセロールはプロテインキナーゼ C の活性化を引き起こす。 $G\alpha_{12}$ ファミリーは 1991 年に同定された 4 番目の $G\alpha$ ファミリーで、 $G\alpha_{12}$ 及び $G\alpha_{13}$ サブユニットから構成され、GTPase の一種である Ras homolog gene family, member A (RhoA)を主に活性化する(8,9)。活性化された RhoA は更に Rho-associated protein kinase (ROCK)などのエフェクター分子を介して、種々の下流分子に作用する(9)。これら $G\alpha$ サブユニットの発現については、表 0-2 にまとめたように、偏在的に発現しているものから個別の細胞に限局して発現するものまで様々である。どのタイプの $G\alpha$ サブユニットと共役するかは GPCR や細胞ごとに規定されており、多くの GPCR は複数の $G\alpha$ サブユニットと共役することが知られている(10)。近年は X 線結晶構造解析技術の進歩に伴い、GPCR の結晶構造が次々と解かれており、構造生物学的観点からも GPCR の情報伝達機構が解明されつつある(11-17)。例えば、G タンパク質との相互作用について最も研究が進んでいる β_2 アドレナリン受容体の場合は、不活性型の結晶構造とリガンド及び $G\alpha_s$ タンパク質と結合した活性型の複合体結晶構造が報告されており(18-21)、これらの結晶構造の比較から、 β_2 アドレナリン受容体はリガンドの結合により、細胞質側の 6 番目のトランスメンブレン(TM)ヘリックスが大きく外向きに移動し、その結果形成された 5 番目の TM ヘリックスとの溝に $G\alpha_s$ タンパク質が結合することが示唆されている。 β_2 アドレナリン受容体以外の GPCR で活性型の結晶構造が解かれている例は限られているものの(11,12)、 β_2 アドレナリン受容体との結合に関与する $G\alpha_s$ タンパク質のアミノ酸残基は他の $G\alpha$ サブユニットのファミリーでも共通して保存されていることなどから、上述した活性化機構は GPCR や G タンパク質の種類を超えて、ある程度共通しているものと考えられている。また、GPCR から解離した $G\beta\gamma$ 複合体は、イオンチャネルの開閉や RGS (regulator of G protein-signaling)への結合等を介して、多様なシグナル伝達に関与することが報告されているが(22)、 β_2 アドレナリン受容体の場合は、 $G\beta\gamma$ 複合体は受容体との直接相互作用こそしないものの、 $G\alpha$ サブユニットの N 末端を安定化することで、GPCR のシグナル伝達反応の促進に関与する役割も果たしていると考えられている(19)。 β_2 アドレナリン受容体と G タンパク質との複合体結晶構造の一部を Rasmussen らの報告(19)から引用し、図 0-3A に示した。

このように G タンパク質を介したシグナル伝達は非常に複雑であるが、GPCR の機能は G タンパク質以外のタンパク質によっても制御されていることが明らかになっている。その代表的な例が、G タンパク質共役型受容体キナーゼ(G protein-coupled receptor kinase; GRK)による GPCR のリン酸化及びそれに伴う β -アレスチンの結合である(23,24)。GRK はプロテインキナーゼファミリーに属するリン酸化酵素であり、リガンドによって活性化された GPCR の細胞内ドメインをリン酸化する働きを持つ。足場タンパク質である β -アレスチンは、リン酸化された GPCR に結合する。具体的には、リン酸化された GPCR の C 末

A



B

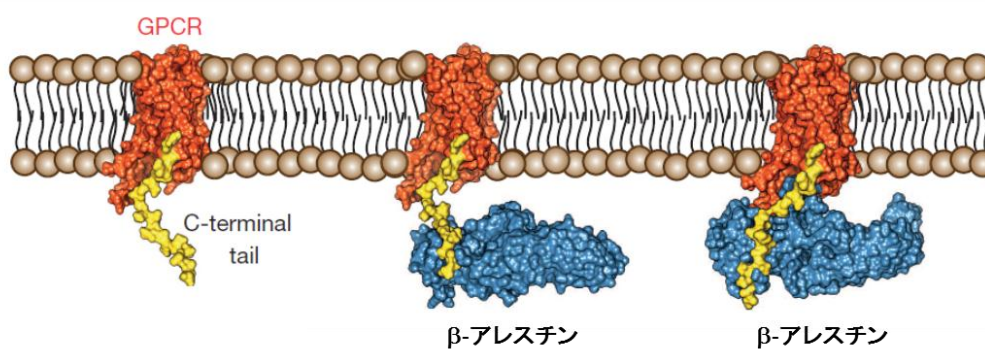


図 0-3 β_2 アドレナリン受容体の結晶構造情報と β -アレスチンの結合モデル

(A) β_2 アドレナリン受容体と $G_{\alpha s}$ タンパク質との複合体結晶構造の一部を Rasmussen らの報告(19)から引用した。(B) β_2 アドレナリン受容体に対する β -アレスチンの二段階の結合モデルを Shukla らの報告(25)から引用した。

端領域とβ-アレスチンの N 末端がまず結合し、これによりβ-アレスチンの構造変化が起こることで、GPCR の TM ヘリックスとβ-アレスチンとの更なる相互作用を誘発するモデルが提唱されており(26)、最近ではβ-アレスチンの結晶構造情報を用いたドッキングモデリング等の実験から、このモデルの妥当性が支持されている(25)。図 0-3B に Shukla らが報告しているβ-アレスチンの上記二段階の結合モデルを引用した(25)。一般的に、GPCR に結合したβ-アレスチンは GPCR の細胞質への移行を引き起こすが、この過程はインターナリゼーションと呼ばれ、リガンドと結合できる受容体量を減少させることでシグナルの脱感作を引き起こすと考えられてきた(27-29)。近年は、こうした抑制的な働きだけでなく、β-アレスチンが各種キナーゼの活性化や転写制御、受容体の活性化等を介して広範なシグナル伝達に関与していることが報告されており、その生理的機能に関心が集まっている(30-33)このように GPCR のシグナル伝達機構は極めて多彩であり、この多様性がシグナルの時間的・空間的な制御を可能にしている。そしてその結果として、一群の細胞集団が統一した機能を発揮し、多細胞生物に特有の組織・臓器特異的なダイナミックな機能発現を可能にしている。GPCR によって制御されるシグナル伝達機構を図 0-4 にまとめた。

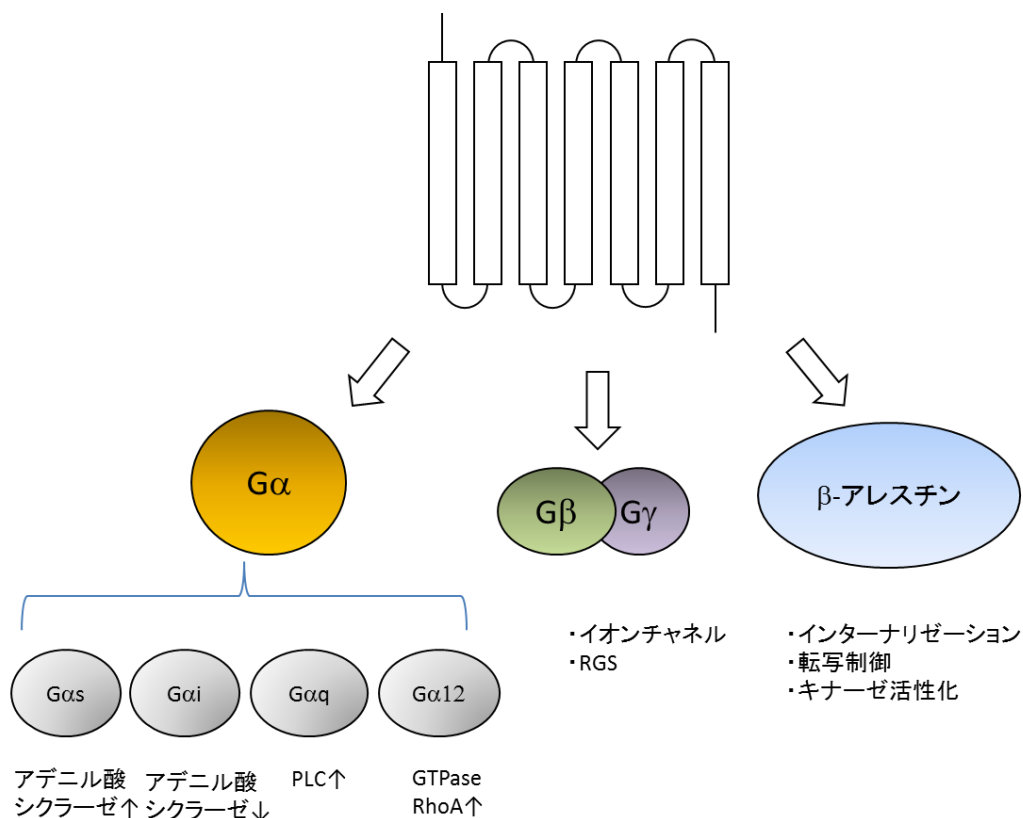


図 0-4 GPCR によって制御されるシグナル伝達機構

3. 受容体理論と薬剤の分子メカニズム

一般的に、受容体と結合し、受容体を活性化状態に固定することで細胞内情報伝達系を作動させる薬物を作動薬(アゴニスト)と呼ぶ。一方、受容体と結合はするが作動活性を持たず生体反応を引き起こさない化合物を拮抗薬(アンタゴニスト)と呼ぶ。拮抗薬はリガンドの結合を競合阻害させることで、リガンドによる応答反応を抑制する作用を持つ。また、作動薬の中には、飽和濃度であっても完全な生物学的反応を起こすことができないものがあり、これらは部分作動薬(パーシャルアゴニスト)と呼ばれる。これに対して、生理的リガンドと同等の生物学的反応を引き起こす化合物は完全作動薬(フルアゴニスト)と呼ばれる。この違いは、内活性(*intrinsic activity*)と呼ばれる薬剤の活性化の強さを表す指標が、部分作動薬は生体内リガンドや完全作動薬よりも小さいことに起因する。GPCR を標的とする既存の薬剤は通常、完全作動薬、部分作動薬、または拮抗薬のいずれかに分類され、現在もそれぞれのタイプの薬剤開発がさかんに行われている。前述の表 0-1 には GPCR を標的とした代表的な医薬品の分子メカニズムを示している。

一方で化合物が結合する作用部位の観点から薬剤を分類すると、従来とは異なる新しいタイプの薬剤に近年期待が集まっている。すなわち、従来の医薬品はリガンド結合部位に作用することで作動活性または拮抗活性を発揮するものが主流であったが、近年の研究からリガンド結合部位とは別の場所に結合することで、GPCR の活性を調節できることが明らかになってきた(34)。リガンド結合部位はオルソステリックサイトと呼ばれるのに対し、受容体のオルソステリックサイト以外の結合部位はアロステリックサイトと呼ばれ、このアロステリックサイトに結合する化合物はアロステリックモジュレーターと総称される。アロステリックモジュレーターは、リガンドの活性を増強するポジティブアロステリックモジュレーターと、リガンドの活性を減弱させるネガティブアロステリックモジュレーターに分類される。またアロステリックモジュレーターによる GPCR の制御はアロステリックモジュレーションと呼ばれる(図 0-5A)。アロステリックモジュレーターが注目される要因の一つは、アロステリックサイトを狙うことで標的 GPCR のサブタイプに対する選択性獲得が容易になり、その結果副作用や毒性の回避が期待できるためである。多くの GPCR には機能や発現部位が異なる複数のサブタイプが存在するため、サブタイプ非特異的な化合物は予期せぬ副作用や毒性を誘発する可能性があり、サブタイプ選択性の高い薬剤を開発することは安全性を担保する上で際めて重要である。アロステリックモジュレーターがサブタイプ選択性を獲得しやすい理由は、リガンドが結合するオルソステリックサイトはサブタイプ間で共通に保存されているのに対して、アロステリックサイトは進化の過程で必ずしも保存される必要がないために、構造が多様であるためだと一般的に考えられている(35,36)。実際にムスカリン受容体やグルタミン酸受容体などの多くの GPCR で、アロステリックモジュレーターがオルソステリックサイトに作用する化合物と比較して、サブタイプに対する選択性が高いことが報告されている(37-40)。また、これまでにムスカリン受容体 2 (M2) と corticotrophin-releasing factor receptor 1 (CRF1R) に関して、アロステリック

クモジュレーターとの複合体結晶構造が報告されている(41,42)。図 0-5B にこれらの複合体結晶構造を引用して示した様に、M2 のアロステリックサイトはオルソステリックサイトの上側(細胞外側)に、また CRF1R のアロステリックサイトはオルソステリックサイトの下側(細胞質側)に存在することが示唆されており、GPCR によってその位置は多様であることが示唆されている。こうした理由から、近年は多くの GPCR でアロステリックモジュレーターを指向した薬剤開発に注目が集まっている。

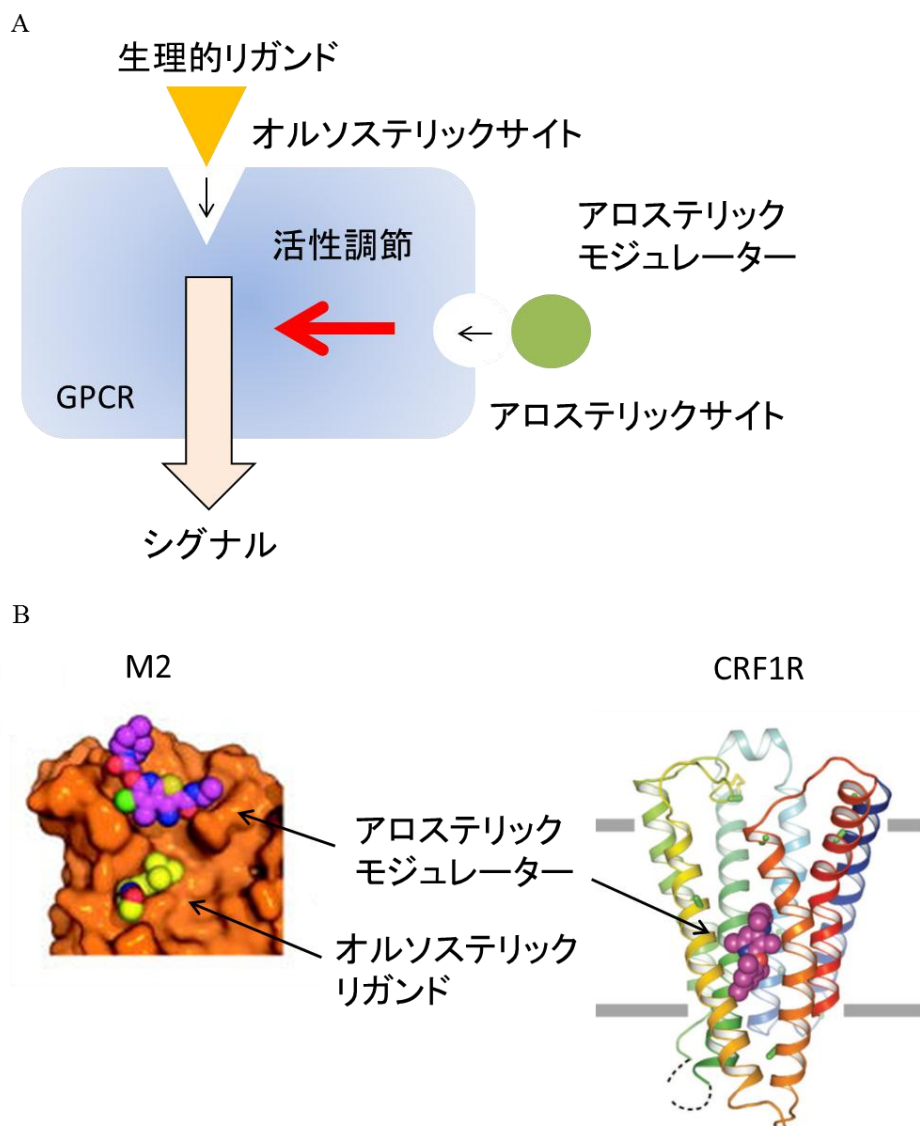


図 0-5 アロステリックモジュレーションの模式図とアロステリックモジュレーターとの複合体結晶構造

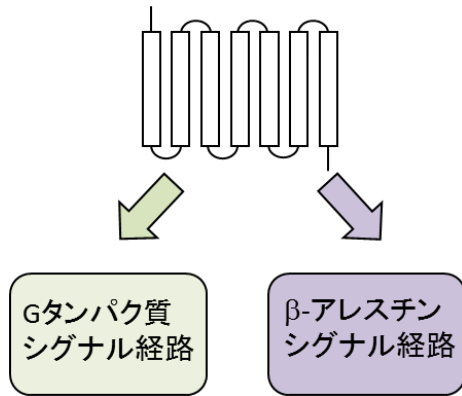
(A) アロステリックモジュレーションの概念を模式図として示した。(B) M2 及び CRF1R のアロステリックモジュレーターとの複合体結晶構造の一部を、それぞれ Kruse ら(42)、また Hollenstein らの報告(41)から引用した。

またアロステリックモジュレーションと同様に、バイアスアゴニズムと呼ばれる受容体の新しい活性化機構が近年明らかになりつつあり、多くの基礎的及び薬剤開発を目指した研究が精力的に行われている。古典的な活性化モデルでは、GPCR に結合した化合物は G タンパク質シグナル経路や β -アレスチンシグナル経路などの複数のシグナル経路を同等の強さで活性化或いは不活性化すると考えられてきた。しかし最近の研究では、生理的リガンドと比較した際に、一部のシグナル経路だけを特異的に活性化する化合物が多数報告されており、この現象はバイアスアゴニズムと呼ばれ注目を集めている(43,44)。こうした性質を有する化合物はバイアスアゴニストと総称され、G タンパク質シグナル経路や β -アレスチンシグナル経路だけを特異的に活性化する G タンパク質バイアスアゴニスト、 β -アレスチンバイアスアゴニストなどが報告されている(図 0-6)。また、バイアスアゴニストの発見に伴い、生理的リガンドの様に複数のシグナル経路を同等の強さで活性化する化合物は、バランス型アゴニストと呼ばれる。バイアスアゴニストの薬剤としての利点は、副作用等望まない効果に関与するシグナル経路の影響を抑える一方で、薬効に関わるシグナル経路だけを特異的に活性化或いは不活性化できる点にある。例えば GPR109a の作動薬であるニコチン酸は脂質異常症の治療薬として臨床の場で使用されているが、皮膚紅潮の副作用が深刻な問題となっている(45)。皮膚紅潮には β -アレスチンシグナル経路の活性化が関与していることが知られているため、 β -アレスチンシグナル経路を活性化させずに、薬効に関わる G タンパク質シグナル経路だけを活性化させるような G タンパク質バイアスアゴニストが、副作用の無い化合物として現在までに創出されている(46)。この他にもこれまで多くの化合物でバイアスアゴニストとしての治療効果が確認されており、多大な関心が寄せられている(44,47)。現在までに報告されている代表的なバイアスアゴニストをバランス型アゴニストと共に表 0-3 に示した。

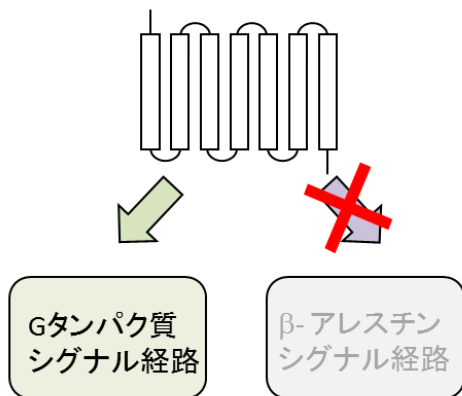
このように GPCR の活性化機構及びシグナル伝達機構は従来考えられていた以上に複雑であり、その分子メカニズムを理解することは安全で効果的な新薬を創出する上で極めて重要である。

一般的に創薬研究は、ゲノム情報解析や遺伝子工学的手法を用いた、創薬標的候補分子の探索から始まる。標的分子が設定されると、その分子に対して活性化或いは阻害等の目的とする薬理活性を持つ化合物のスクリーニングが実施され、このスクリーニングで見出された化合物はヒット化合物と呼ばれる。通常、ヒット化合物は薬理活性や物性、安定性などが医薬品として不十分であるため、ヒット化合物の化学構造の変換を実施し、医薬品として好ましい性質を持った化合物に改変される。こうして得られた化合物はリード化合物と呼ばれ、このリード化合物を出発点として、有効性や安全性を高めるべく更なる最適化研究が実施される。このヒット・リード化合物を選抜する過程は、化合物探索研究と一般的に呼ばれる。化合物探索研究は通常は細胞レベルでの試験からスタートし、最終的にはマウスやラットなどの動物を用いた試験で化合物の有効性・安全性を確認する。動物レベルで有効性・安全性が確認された化合物はヒトを対象とした臨床試験へと進む。臨床試

バランス型アゴニスト



Gタンパク質バイアスアゴニスト



β-アレスチンバイアスアゴニスト

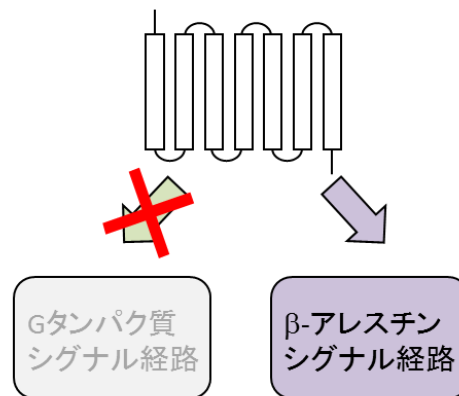
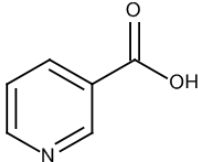
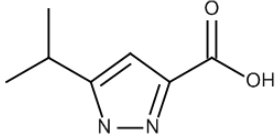


図 0-6 バイアスアゴニズムのコンセプト

表 0-3 代表的なバランス型アゴニスト及びバイアスアゴニスト

| 標的GPCR | 化合物 | タイプ | 構造式 |
|----------------------|----------------|----------------------|---|
| GPR109a | ニコチン酸 | バランス型アゴニスト |  |
| GPR109a | 2a | Gタンパク質 バイアスアゴニスト |  |
| アンジオテンシン I 受容体拮抗薬 | Angiotensin II | バランス型アゴニスト | NH ₂ -DRVYVHPF-COOH |
| アンジオテンシン I 受容体拮抗薬 | SII | β-アレステン バイアスアゴニスト | NH ₂ -SarRVIVHPI-COOH |
| PTH1R | PTH | バランス型アゴニスト | PTH(7-34) |
| PTH1R | PTH-BL | β-アレステン バイアスアゴニスト | [D-Trp ₁₂ , Trp ₃₄] PTH(7-34) |

験は 3 つのフェーズで構成されており、ヒトに対する有効性や安全性が確認された化合物が最終的に厚生労働省に承認され、新薬として上市される。医薬品の創出には一般的に 10 年から 20 年の歳月が必要とされるが、ヒット・リード化合物の探索過程は、研究開発の出発点となる化合物を同定する極めて重要なステップである。ヒット・リード化合物創出のために多数の化合物検体を効率的にスクリーニングする手法が **high-throughput screening (HTS)** であり、HTS は近年の創薬研究における重要な戦略として位置づけられている。従来の GPCR の探索研究は HTS を用いて、標的 GPCR に対する作動薬または拮抗薬のヒット化合物を見出すこと、そしてそのヒット化合物の活性及び物性を化学構造変換によって向上させ、リード化合物を創出することに重点が置かれていた。しかし近年、アロステリックモジュレーションやバイアスアゴニズム等の新しい分子機構が明らかになるにつれ、従来の探索研究の進め方が少しずつ変わりつつある。すなわち、従来の様に単純な作動薬や拮抗薬を狙うだけでなく、HTS ではなるべく多様な分子メカニズムを有する化合物を見出し、得られた化合物の活性化機構や薬理作用を分子レベルで精査することで、化合物ごとの薬効や副作用を予測することが主流となりつつある。そしてこの変化に伴い、分子薬理や分子機構の理解の重要性がより一層増している。

4. 本研究について

本研究では GPCR を標的とした新規薬剤開発を目的として、以下の検討を実施した。

第一章では脂質異常症治療薬開発に向けて GPR81 を標的に、低分子作動薬探索のための HTS 及びその後の最適化研究を実施し、リード化合物を取得した。薬理的解析の結果、本リード化合物が薬剤として優れたプロファイルを有していること、そして *in vitro* の薬理的解析が *in vivo* における薬効予測や副作用回避のために極めて重要であることを明らかにした。

第二章では、抗肥満薬開発のために、メラニン凝集ホルモン受容体 1 (MCHR1) 拮抗薬の作用機序を分子レベルで調べるべく、詳細な生化学的解析を実施した。この結果、本研究で用いた MCHR1 拮抗薬はアロステリックモジュレーターとして作用すること、また MCHR1 の下流の各種シグナルを同程度に抑制するバランスのとれた化合物であることなどが示され、現在までに報告されている MCHR1 拮抗薬のいずれのタイプとも異なるユニークな性質を有していることを明らかにした。

第三章では、睡眠障害治療のための MT₂ メラトニン受容体作動薬開発を目指して、リード化合物の受容体活性化機構の解析を行った。その結果、本化合物は選択性やインターナリゼーション促進に関して、従来の睡眠障害治療薬とは異なる特徴的なプロファイルを有しており、副作用を軽減した新しいタイプの薬剤となり得ることを明らかにした。

第一章

GPR81 作動薬の探索及びリード化合物の薬理的解析

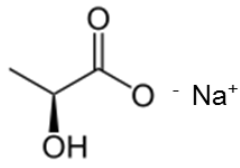
1-1 緒言

GPR81 は、ニコチン酸受容体である GPR109a とアミノ酸レベルで 52%の同一性を有する GPCR である(48,49)。GPR81 は長年生理的リガンドが不明なオーファン GPCR として知られてきたが、最近の報告により乳酸(図 1-1)がその生理的リガンドであることが明らかとなった(50,51)。GPR81 は GPR109a と同様に脂肪細胞で発現量が高く、G α_i タンパク質と共役することで、乳酸刺激に応答した脂肪分解抑制機能を有している(51-53)。脂肪分解の抑制は、脂質の成分である血中遊離脂肪酸量の低下に繋がることが期待される。こうした知見から GPR81 は、脂質が過剰に蓄積する状態である脂質異常症の治療薬の創薬標的としての可能性が示唆される。

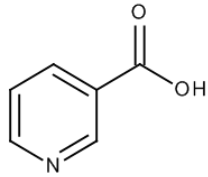
現在臨床の場では、GPR109a の作動薬であるニコチン酸(図 1-1)が脂質異常症の有効な治療薬として幅広く使われている(45)。ニコチン酸は GPR109a を活性化することで脂肪細胞における脂肪分解を抑制し、この作用が血中遊離脂肪酸、ひいてはコレステロールやトリグリセリド量の減少に繋がると考えられている(54,55)。その一方でニコチン酸は副作用として皮膚紅潮を惹起することが知られており、このためにニコチン酸による治療を断念せざるを得ない患者が多くいることも事実である(45,55-57)。そのため、ニコチン酸と同程度の薬効を持ち、皮膚紅潮の副作用を伴わない薬剤を開発することが強く望まれている。

近年の研究では、表皮ランゲルハンス細胞における GPR109a 活性化を介したプロスタグランジン D₂ の放出が、皮膚紅潮へ関与することが明らかになってきた(56,58,59)。GPR81 の発現は脂肪細胞に限定されており、他の組織では極めて少ないことから、GPR81 に選択的な作動薬は、皮膚紅潮を伴わない新しい脂質異常症の治療薬の創出に繋がることが期待される。

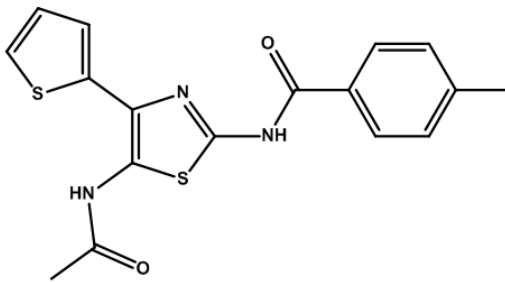
本章では、新規脂質異常症治療薬創出のための HTS の実施、並びにリード化合物 AT2 の創出について述べる。また、薬理的解析の結果明らかとなった、AT2 のリード化合物としてのプロファイルについて述べる。



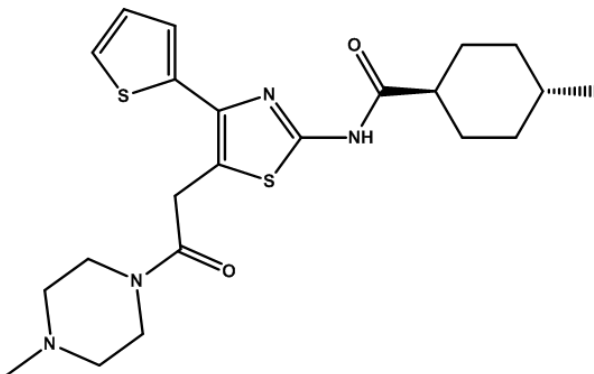
L-乳酸ナトリウム



ニコチン酸



AT1



AT2

図 1-1 GPR81 作動薬の化学構造式

1-2 結果

1-2-1) GPR81 作動薬の探索

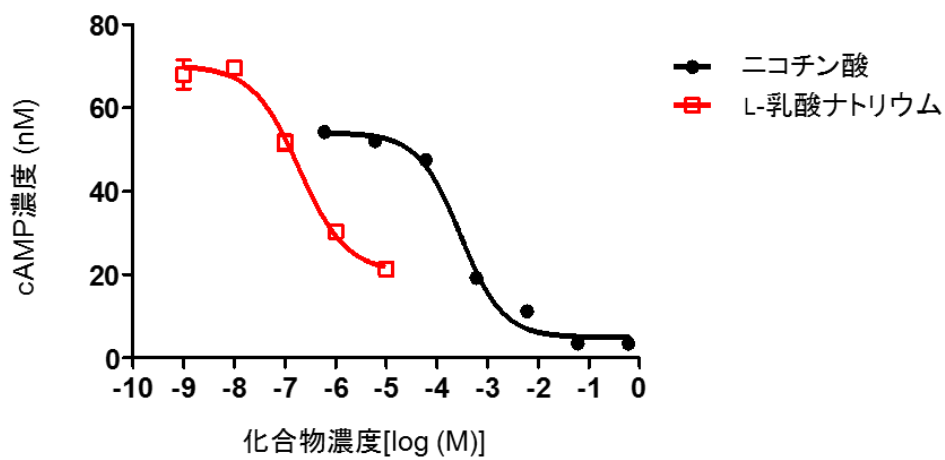
GPR81 作動活性を有する低分子化合物の探索を目的として、Chinese hamster ovary (CHO)細胞にヒト GPR81 発現プラスミドを導入し、ヒト GPR81 安定発現細胞を樹立した。この安定発現細胞を用い、GPR81 によって活性化される $G\alpha_i$ タンパク質の作用、すなわち細胞内 cAMP 量の抑制活性を検出する評価系(細胞内 cAMP 濃度測定系)を構築した。GPR81 の生理的リガンドである L-乳酸ナトリウム(図 1-1)は濃度依存的に細胞内 cAMP 量を抑制し、その EC_{50} 値は $280 \mu\text{M}$ であった(図 1-2A)。この細胞を用い、約 70 万の化合物を各々 $3 \mu\text{M}$ の濃度でスクリーニングし、GPR81 作動活性のある化合物を探索した。続いて細胞傷害性、自家蛍光などによって起こる偽陽性を排除するために、GPR81 を発現していない細胞で評価を行った結果、22 化合物で GPR81 発現細胞特異的な活性が認められた。これらの化合物は、その化学構造により 4 種類に分類された。この中で最も活性が強かった AT1 (図 1-1)は $810 \pm 93 \text{ nM}$ の EC_{50} 値を示し、完全作動薬として挙動した(図 1-2B)。続いて本化合物の L-乳酸ナトリウムとの拮抗性について調べた。もし AT1 がアロステリックモジュレーターとして作用していれば、AT1 の活性は L-乳酸ナトリウム存在下で上昇することが予想される。しかし AT1 は L-乳酸存在下でも活性が変化しないことから、オルソステリックサイトに結合する作動薬であることが示唆された(図 1-2C)。

AT1 の更なる活性向上と物性改善を目指した化学構造の最適化研究を共同研究先の Takeda Cambridge で行った結果、AT2 (図 1-1)を見出した。AT2 は AT1 と同様に完全作動薬として挙動し、その EC_{50} 値は $58 \pm 5.4 \text{ nM}$ に向上した(図 1-2B)。AT2 の生物学的活性と物性パラメータを表 1-1 に示した。また、AT2 創出に至るまでのスクリーニングのフローを図 1-3 にまとめた。

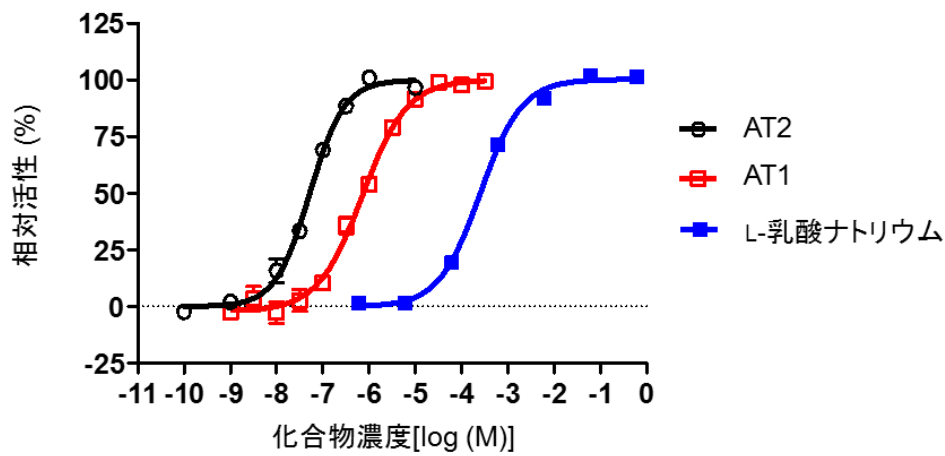
1-2-2) GPR81 に対する選択性評価

GPR109a 作動薬であるニコチン酸(図 1-1)は脂質異常症の治療に有効であるが、同時に皮膚紅潮の副作用を惹起することが知られている。そこで、GPR109a の活性化を伴わない GPR81 作動薬を見出すことが、副作用の無い脂質異常症治療薬創出のために必須だと考え、GPR109a の活性化を測定する評価系、すなわち GPR109a と共役する $G\alpha_i$ タンパク質による細胞内 cAMP 量の抑制活性の検出系を構築した。GPR109a の生理的リガンドであるニコチン酸が $180 \pm 31 \text{ nM}$ の EC_{50} 値で GPR109a を活性化するのに対して、AT2 は $30 \mu\text{M}$ まで濃度を上げて活性が認められず、GPR81 に対して非常に選択性の高い化合物であることが明らかとなった(図 1-2A, D)。

A



B



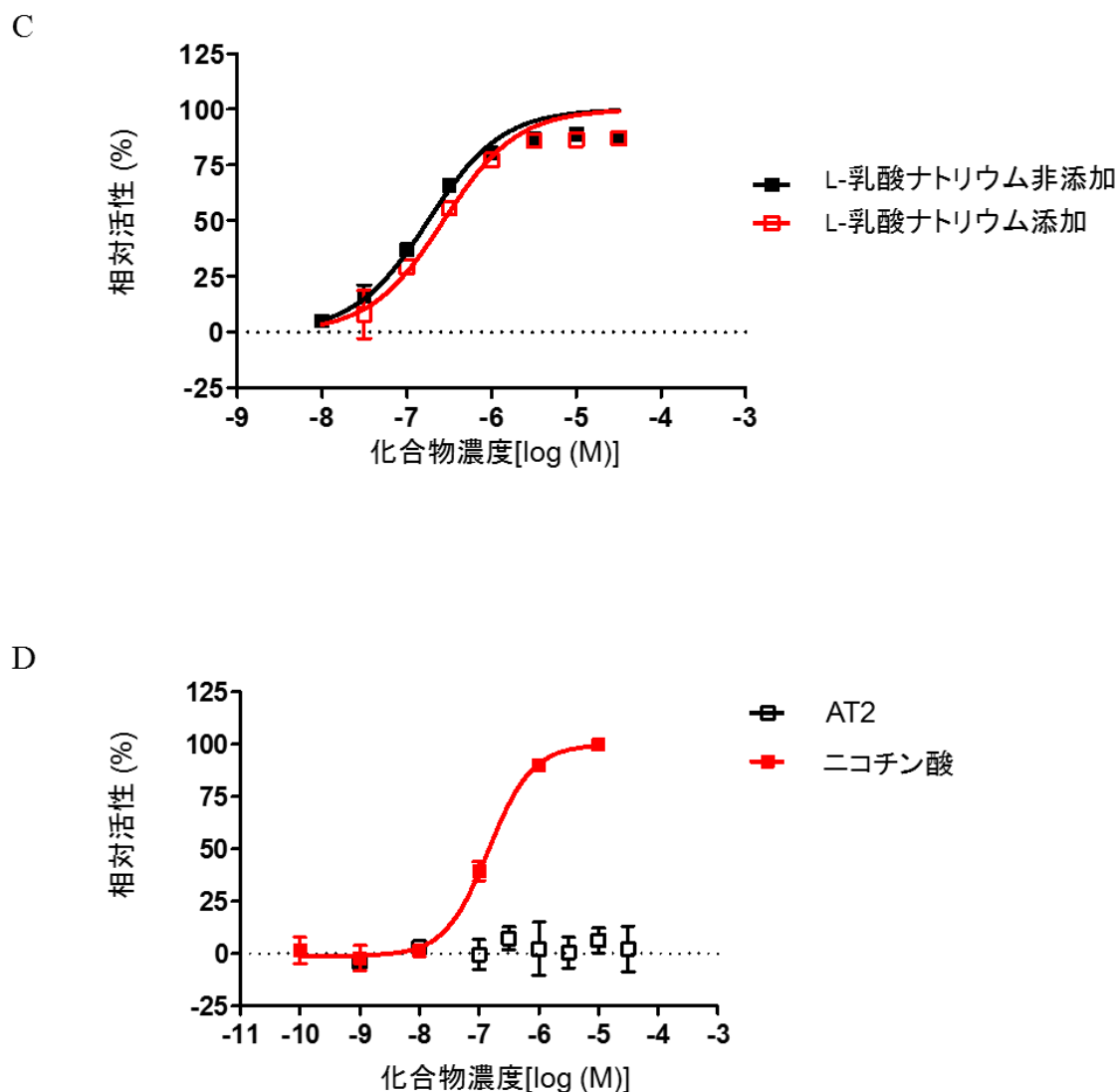


図 1-2 ヒト GPR81 及び GPR109a に対する活性

(A) L-乳酸ナトリウム(□)及びニコチン酸(●)のヒト GPR81 及びヒト GPR109a に対する濃度依存的な効果を、細胞内 cAMP 濃度測定系を用いて測定した。(B) AT1 (□)、AT2 (○)、及び L-乳酸ナトリウム(■)のヒト GPR81 に対する作用を測定した。L-乳酸ナトリウムの最大活性を 100%、L-乳酸ナトリウム非添加時のベースの活性を 0%として相対活性を算出した。(C) 50 μ M の L-乳酸ナトリウム存在下(□)または非存在下(■)における AT1 のヒト GPR81 に対する濃度依存的な効果を、細胞内 cAMP 濃度測定系を用いて測定した。(D) AT2 (□) 及びニコチン酸(■) のヒト GPR109a に対する濃度依存的な効果を、細胞内 cAMP 濃度測定系を用いて測定した。ニコチン酸の最大活性を 100%、ニコチン酸非添加時のベースの活性を 0%として相対活性を算出した。mean \pm SEM (quadruplicate)。

表 1-1 AT2 の生物学的活性及び物性パラメータ

| 試験名 | 測定値 |
|--|----------|
| ヒト GPR81 cAMP 評価系 EC50 nM | 58 ± 5.4 |
| マウス GPR81 cAMP 評価系 EC50 nM | 50 ± 15 |
| ヒト GPR109a cAMP 評価系 EC50 μM | >30 |
| 溶解性 (mg/mL) pH 6.8 ¹⁾ | 27 |
| 膜透過性(nm/s) ²⁾ | 36 |
| 代謝安定性(ヒト) (%/min/mg) ³⁾ | <1 |
| 代謝安定性(マウス) (%/min/mg) ³⁾ | 13 |
| CYP2C9 阻害% inh. @ 10 μM ⁴⁾ | <35 |
| CYP2D6 阻害% inh. @ 10 μM ⁴⁾ | <35 |
| CYP3A4 阻害% inh. @ 10 μM ⁴⁾ | <35 |
| 血漿タンパク質結合 (%) (ヒト/マウス) ⁵⁾ | 93/96 |
| 薬物動態 F % ⁶⁾ | 19 |
| 薬物動態 ip Cmax (μMol) ⁶⁾ | 6.3 |
| 薬物動態 ip T _{1/2} (h) ⁶⁾ | 0.56 |

表中 1)~6)の試験方法を以下に記す。

- 1) 溶解性試験:粉末の AT2 に pH6.8 の溶液を添加し室温で 18 時間攪拌した。サンプルを濾過し、濾液に含まれる AT2 の量を HPLC (High performance liquid chromatography) で測定した。
- 2) 膜透過性:本試験は化合物の受動拡散による膜透過速度を求めるために実施した。96 穴プレートのフィルターの上に人工リン脂質の膜を塗布し、ドナー側の緩衝液に AT2 を添加した。一定時間後に、ドナー側からアクセプター側へ移行した AT2 の量を HPLC で測定することで、化合物の膜透過速度を算出した。
- 3) 代謝安定性試験:AT2 とマウスまたはヒト由来の肝ミクロソームを 37°C で 30 分間反応後、未変化体の量を HPLC で測定することで、化合物の代謝速度を算出した。
- 4) CYP 阻害試験:チトクロム P450 (CYP)は多くの医薬品の薬物代謝に関与することが知られている。CYP の分子種である 2C9、2D6 及び 3A4 の代謝活性に AT2 が与える影響を調べた。10 μM の AT2 存在下または非存在下で、各分子種の基質プローブとヒト肝ミクロソームを 37°C で 30 分間反応した。サンプル中に含まれる生成物の量を HPLC で検出し、AT2 による各分子種の阻害率を求めた。

5) 血漿タンパク質結合:薬物は血中ではその一部が血漿タンパク質と結合した状態で存在しており(結合型)、結合型は生体膜を通過できない。このため、血漿タンパク質への結合率は服用量や薬効に影響を及ぼす。本試験では、半透膜で区切った区分の片方にのみ血漿タンパク質を添加し、そこへ AT2 を添加した。平衡状態における血漿タンパク質存在区分と非存在区分での AT2 量を LC/MS/MS で測定することで、血漿タンパク質への結合量を測定した。

6) 薬物動態試験:マウスへ AT2 を経口投与し、未変化体として循環血中へ到達した化合物量を LC/MS/MS で測定した。F%は、静脈内投与に対する循環血中薬物の割合、Cmax は薬物投与後に得られる血中濃度の最大値、T_{1/2} (h)は薬物の血中濃度が消失相にある時間帯において、ある時点からその半分の濃度になるまでに要する時間を示す。以上の物性パラメータは共同研究先の Takeda Cambridge で取得された。

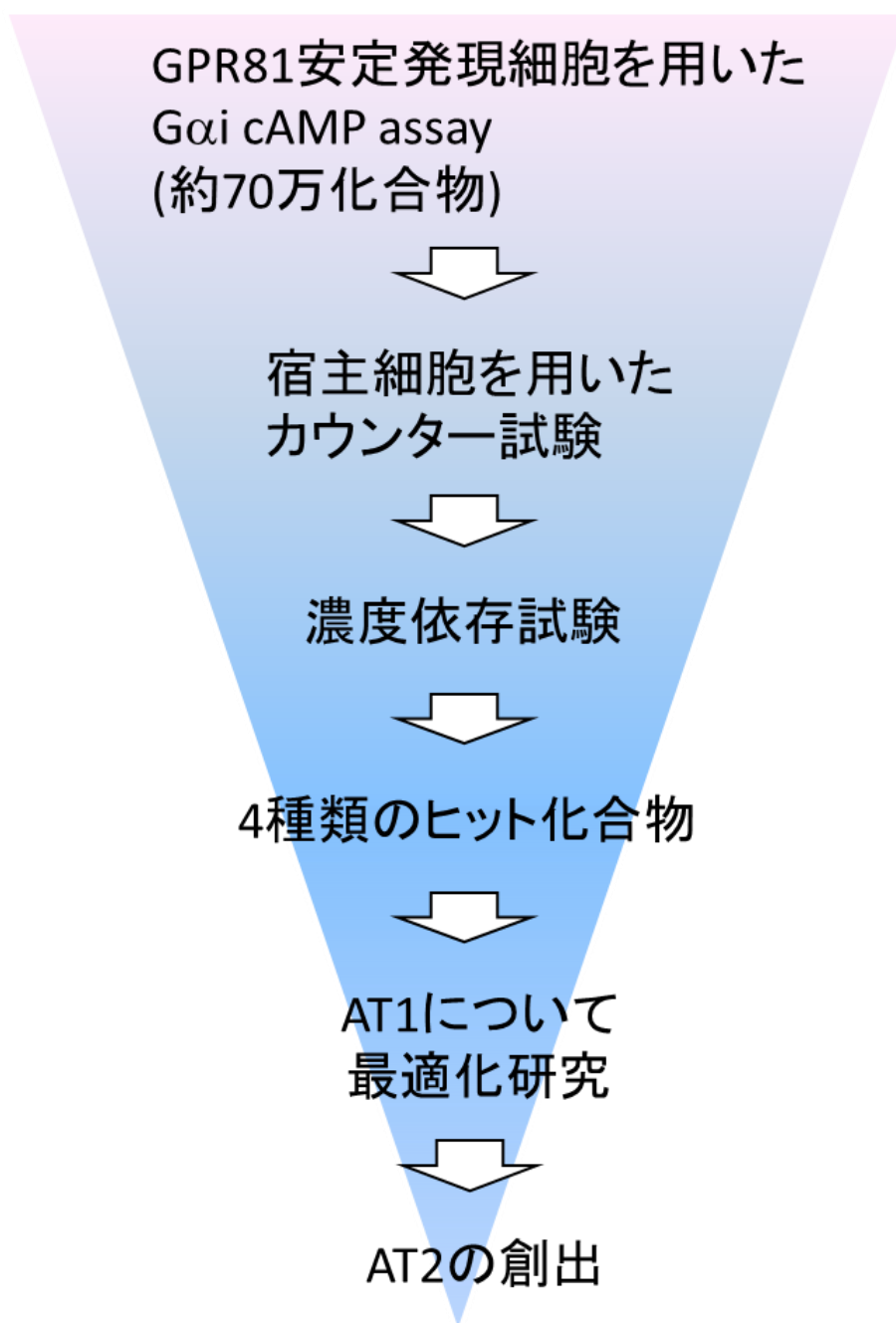


図 1-3 GPR81 作動薬のスクリーニングのフロー

1-2-3) 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪分解抑制作用

GPR81 は GPR109a と同様に、脂肪細胞での脂肪分解、すなわちトリグリセリドの脂肪酸とグリセロールへの加水分解を抑制する機能を有することが予想される(51,52)。そこで分化 3T3-L1 脂肪細胞における AT2 の脂肪分解抑制作用の有無を調べた。トリグリセリドが加水分解された際に産生されるグリセロールの量を脂肪分解の指標として測定したところ、AT2 はニコチン酸と同様に、濃度依存的にグリセロール量を減少させることが明らかとなった(図 1-4)。以上より、AT2 は分化 3T3-L1 脂肪細胞において脂肪分解抑制作用を有すること、そしてその脂肪分解抑制活性はニコチン酸と同程度であることが示された。

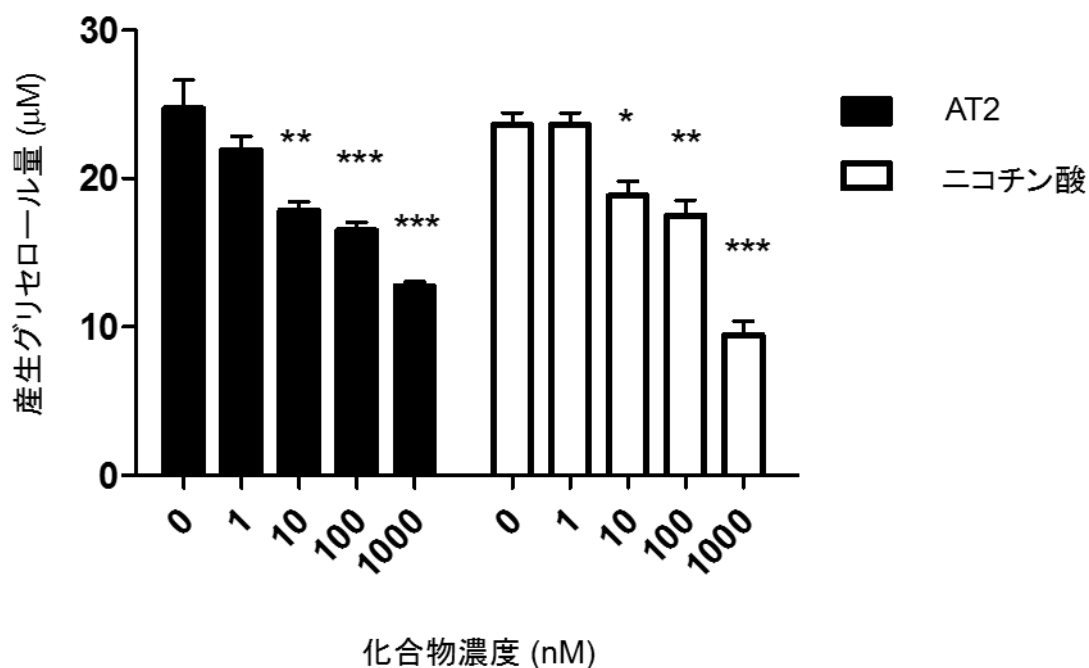


図 1-4 3T3-L1 脂肪細胞における AT2 の脂肪分解抑制作用

トリグリセリドから加水分解されるグリセロール量を測定することで、3T3-L1 脂肪細胞における AT2 及びニコチン酸の脂肪分解抑制作用を評価した。mean ± SEM (triplicate)。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ (薬剤未処置との比較、統計解析は one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test)

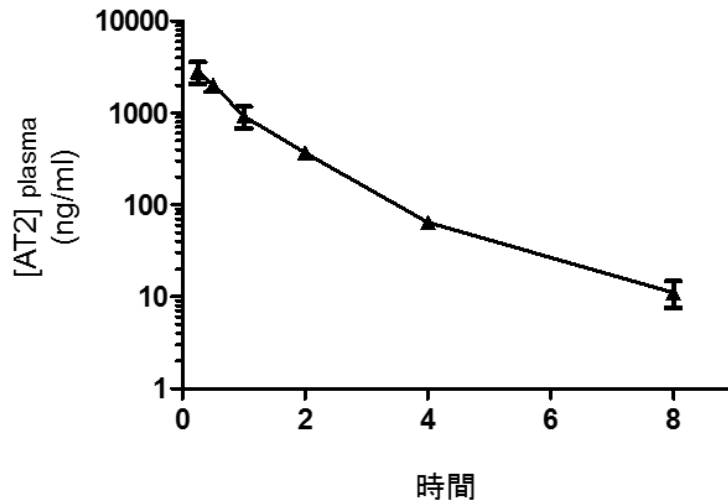
1-2-4) *in vivo*における薬効評価と皮膚紅潮作用

AT2 の薬物動態を調べるために、雄性 C57/B16 マウスへ 10 mg/kg で AT2 を腹腔内投与した。その結果、服用した薬物のうち血中へ到達した割合を表すバイオアベイラビリティは 71%で、薬物投与後に得られる血中濃度の最大値を表す C_{max} は 6.3 μM と良好なプロファイルを示したため、この化合物を用いて *in vivo* 試験を実施した。AT2 の薬物動態プロファイルを図 1-5A に示した。

*in vivo*における脂肪分解抑制作用を調べるために、まずニコチン酸を用いて予備検証を行った。ニコチン酸を給餌マウスに腹腔内投与し、血中の遊離脂肪酸含量を測定したところ、ニコチン酸の用量に依存的な遊離脂肪酸量の低下が確認された(図 1-5B)。そこで次に 100 mg/kg の AT2 を絶食マウスに腹腔内投与した。これは一般的にインスリンは脂肪分解を抑制することが知られており(60)、絶食させることで体内のインスリンレベルが減弱したマウスでは、脂肪分解が惹起されて AT2 の脂肪分解抑制作用が検出されやすくなると考えたためである。その結果、絶食マウスでは約 35%の遊離脂肪酸量の低下が確認された(図 1-6A)。また、AT2 による絶食マウスにおける血中遊離脂肪酸量の変化量は、100 mg/kg のニコチン酸投与の場合とほぼ同程度であった。続いて給餌マウスに腹腔内投与したところ、約 50%の遊離脂肪酸量の低下が確認されたことから(図 1-6A)、GPR81 を介した脂肪分解抑制作用はインスリンとは異なる基序に基づくことが示唆された。

続いて、この条件下で AT2 が皮膚紅潮を起こすかどうかを調べた。Richman らの報告(46)に従って、レーザードップラー血流装置を用いて、麻酔処理マウスの耳の皮膚血流量を測定した。200 mg/kg のニコチン酸を腹腔内投与すると、投与後 10 分間に渡って血流の上昇が確認された。一方で AT2 を 100 mg/kg で腹腔内投与した際には、同じ期間において血流の上昇は認められなかった(図 1-6B)。*in vivo*における薬効評価及び血流量測定は共同研究先の Takeda Cambridge で実施された。

A



B

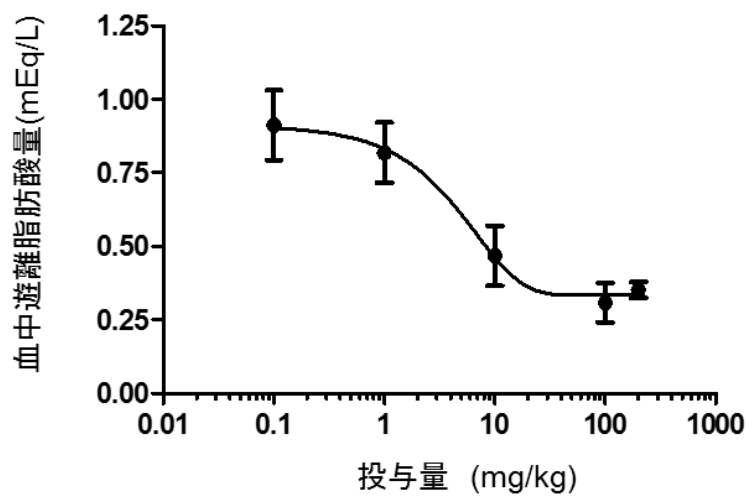
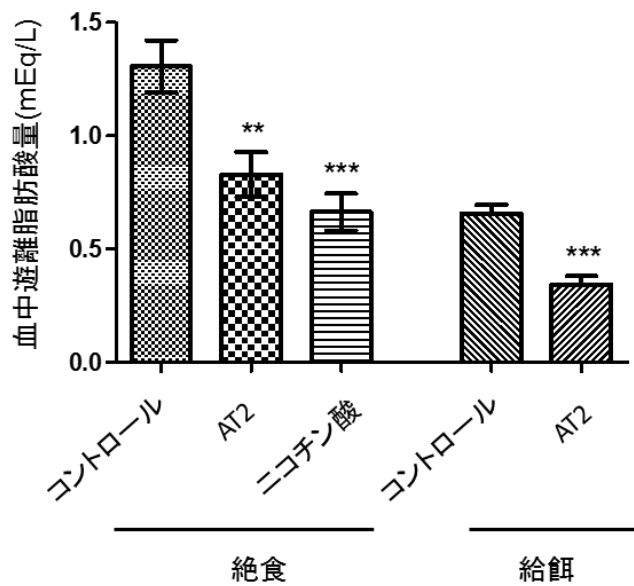


図 1-5 AT2 の薬物動態プロファイル及びニコチン酸の *in vivo* における効果
(A)雄性 C57/B16 マウスへ AT2 を 10 mg/kg で腹腔内投与し、薬物動態プロファイルを測定した。mean \pm SEM (triplicate)。 (B)薬物投与 15 分後の血中遊離脂肪酸量を測定することで、ニコチン酸の *in vivo* における用量依存的な脂肪分解抑制作用を評価した。mean \pm SEM (quintuplicate)。

A



B

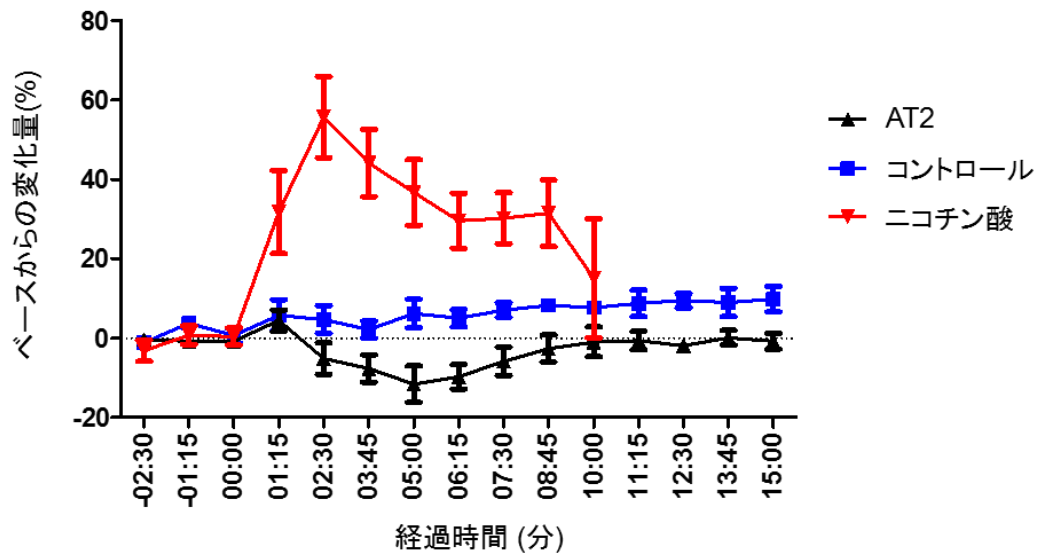


図 1-6 AT2 の *in vivo* における効果

(A) 100 mg/kg の AT2 及びニコチン酸を腹腔内投与した際の *in vivo* における脂肪分解抑制作用を血中遊離脂肪酸量を測定することで評価した。mean \pm SEM (sextuplicate)。** $: P < 0.01$; *** $: P < 0.001$ (薬剤未処置との比較、統計解析は one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test) (B) 100 mg/kg の AT2 及び 200 mg/kg のニコチン酸を腹腔内投与した際の *in vivo* における皮膚高潮作用をレーザードップラー血流装置を用いて測定した。mean \pm SEM (sextuplicate or more)。

1-3 まとめと考察

本章では GPR81 安定発現細胞を使用した HTS を実施し、4 種類の新規 GPR81 作動薬を見出した。これらの化合物のうち最も活性が強かったのはアミノチアゾール誘導体の AT1 であり、この化合物はオルソステリックサイトに結合する完全作動薬であることが示唆された。そこで AT1 の更なる活性向上と物性改善のために最適化研究を行い、AT2 を創出した。続いて AT2 の *in vitro* における詳細な薬理的解析を実施し、以下 3 つの理由から AT2 がリード化合物として極めて優れたプロファイルを有していることを明らかにした。

第一に AT2 の EC₅₀ 値はヒト GPR81 及びマウス GPR81 に対して、それぞれ 58 ± 5.4 nM 及び 50 ± 15 nM と高活性を示す一方で、GPR109a に対しては活性を示さず、非常に優れた選択性を有している(図 1-2)。GPR109a の活性化は、脂肪細胞における脂肪分解抑制を介して、脂質異常症に対する治療効果が期待される一方で、皮膚のランゲルハンス細胞や角質細胞では紅潮を惹起することが副作用として知られている(45,55-57,61)。従って、GPR81 に対して高活性を示し、且つ GPR109a に対して活性を示さない AT2 は、皮膚紅潮の副作用を起こさない新しいタイプの脂質異常症治療薬として効果を発揮することが期待される。

第二に AT2 は分化 3T3-L1 脂肪細胞で脂肪分解抑制作用を示した(図 1-4)。HTS 及びその後の *in vitro* の実験では CHO 細胞に GPR81 を過剰発現したリコンビナント系を使用した。こうした人工発現系は一般的に GPCR の発現量が高いため、シグナルの増幅がかかりやすく、作動薬に対する感度が高くなると考えられる。これに対し、脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞における GPR81 の発現量は、生理的条件に近く低いことが予想される。従って 3T3-L1 脂肪細胞で AT2 が活性を発揮したという事実は、AT2 が *in vivo* でも十分活性を発揮する可能性があることを示唆するものであり、*in vivo* 試験を進めていく上で意義深いデータである。

第三に、AT2 はオルソステリックサイトに結合する完全作動薬として挙動する(図 1-2B, C)。部分作動薬の場合、生理的リガンド存在下では、生理的リガンドの最大活性を押し下げてしまうため、事実上の拮抗作用を発揮してしまい、期待した薬効が発揮されない可能性がある。また AT2 がポジティブアロステリックモジュレーターの場合は、選択性獲得等の利点はあるものの、生理的リガンド存在下のみでしか薬効が発揮されないことが予想される。そのため、*in vivo* における作用の検証という本実験の目的に限っては、アロステリックモジュレーターの特徴が欠点として作用してしまうことが予測される。この点、完全作動薬の AT2 は生理的リガンドの濃度に関係なく薬効発揮が期待されるため、*in vivo* 作用の検証に適したツール化合物であると考えられる。

こうした *in vitro* の薬理的解析結果を踏まえ、AT2 の *in vivo* における薬効及び皮膚紅潮に与える影響を評価した。AT2 はマウスにおいて良好な動態を示し、血中の遊離脂肪酸量を有意に低下させた(図 1-5A, 1-6A)。そして期待された通り、皮膚紅潮の指標である皮膚

血流量の増加は認められなかった。一方、ニコチン酸は血中遊離脂肪酸量を低下させるものの、顕著な皮膚血流量の増加を誘発した(図 1-6B)。以上の結果から、AT2 は従来の脂質異常症治療薬であるニコチン酸と比較して、*in vivo* でより優れた薬効・副作用プロファイルを有するリード化合物であることが明らかとなった。これらの結果は、*in vitro* で実施した薬理的解析の結果から予測された通りのものである。すなわち、AT2 は GPR109a には作用せず、GPR81 を選択的に活性化することから、表皮細胞では GPR109a 活性化を介したプロスタグランジン D₂ 産生に基づく皮膚紅潮を惹起することなく、脂肪細胞における GPR81 活性化を介した脂肪酸分解抑制を実現することができた(図 1-7)。これらの知見は創薬探索研究における *in vitro* の薬理的解析の重要性を裏付けるものである。

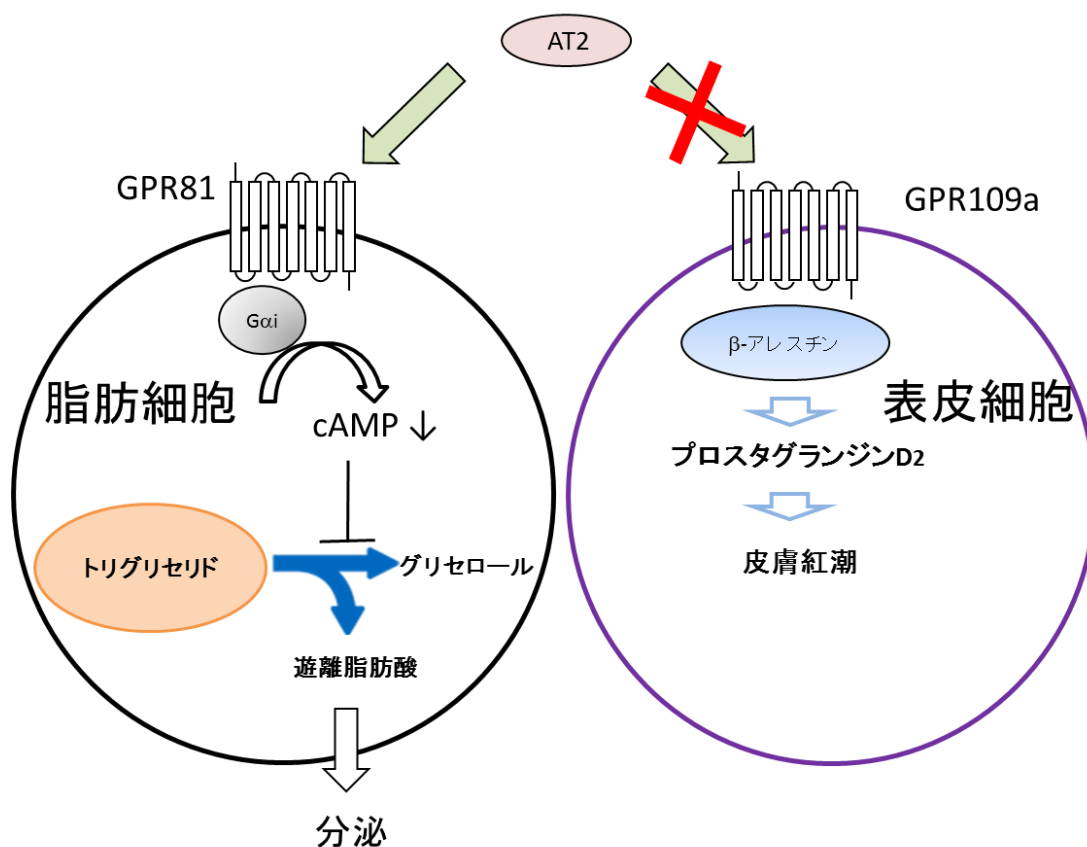


図 1-7 AT2 の作用メカニズムの模式図

1-4 実験方法

1) 実験材料

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、HEPES、penicillin/streptomycin 及び Hanks' balanced buffered saline (HBSS)は Life Technologies (Carlsbad, CA)から購入した。MEM Alpha without DNA/RNA は日研生物医学研究所から購入した。Fatty acid-free bovine serum albumin (BSA)はシグマアルドリッチジャパンから購入した。Dialyzed fetal bovine serum (dFBS)、 fetal bovine serum (FBS)及び Fetal Clone III (FCIII)はそれぞれ JR Scientific (Woodland, CA)、AusGeneX (Brisbane, Australia)及び Hyclone/Perbio (Beaconsfield, France)から購入した。これら以外の実験材料は和光純薬から購入した。また、AT1 *N*-(5-acetamido-4-(2-thienyl)-1,3-thiazol-2-yl)-4-methylbenzamide 及び AT2 4-methyl-*N*-(5-(2-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoethyl)-4-(2-thienyl)-1,3-thiazol-2-yl) cyclohexanecarboxamide の構造を図 1-1 に示した。

2) 安定発現細胞の構築

ヒト GPR81、マウス GPR81 及びヒト GPR109a をコードした cDNA 断片を pAKKO-111 H プラスミド(62)に挿入し、発現ベクターを構築した。ジヒドロ葉酸還元酵素欠損 CHO dhfr⁻細胞を 100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、10 mM HEPES 及び 10% FBS 含有 MEM Alpha without DNA/RNA で培養し、上記発現ベクターをエレクトロポレーションで導入した。翌日、単一クローンを得るために、細胞懸濁液を 100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、10 mM HEPES 及び 10% dFBS 含有 MEM Alpha で 10,000 倍希釈し、96 穴プレートに播種した。細胞は 37°C に保温した 5% CO₂ 存在下のインキュベーターで 10 日間培養した。得られた GPR81 と GPR109a のクローンは、L-乳酸ナトリウムとニコチン酸でそれぞれ応答を確認した。

3) 細胞内 cAMP 濃度の測定

細胞内 cAMP 濃度は Cisbio Bioassays 社 (Gif-sur-Yvette, France) から購入した homogenous time-resolved fluorescence (HTRF) kit を用いて、製品添付のプロトコルに従って測定した。具体的には、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin 及び 10% dFBS 含有 MEM Alpha without DNA/RNA で培養した GPR81 及び GPR109a 安定発現細胞を回収後、 1.6×10^7 cells/mL になるように cAMP assay buffer (5 mM HEPES、500 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine 及び 0.1% BSA 含有 HBSS) で懸濁し、5 µl を 384 穴浅底プレート (Greiner) に添加した。続いて評価化合物及び 2 µM のフォルスコリンを含む cAMP assay buffer 5 µl を添加し、室温で 1 時間反応した。その後、10 µl の d2-cAMP 及び anti-cAMP cryptate 懸濁溶液を添加し、1 時間反応した後、プレートリーダー Envision (PerkinElmer) で蛍光強度 (665 nm, 620 nm) を測定した。

4) 3T3-L1 脂肪細胞を用いた脂肪分解抑制作用

未分化の 3T3-L1 脂肪前駆細胞は 100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin 及び 10% FCIII 含有 DMEM (high glucose) で 7 日間培養した後、分化培地(上記培地に 500 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine、10 µg/ml insulin 及び 1 µM dexamethasone を添加)で更に 7 日間培養することで分化を誘導した(63)。分化した 3T3-L1 脂肪細胞は 3.0×10^4 cells/well で 96 穴コラーゲンプレート(Corning)に播種し、GPR81 の発現を誘導するために 1 µM の pioglitazone (peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma 作動薬)を添加後、37°C に保温した 5% CO₂ 存在下のインキュベーターで 24 時間培養した。培地を除去した後、HBSS で 2 度洗浄し、0.1% BSA 含有 HBSS で溶解した評価化合物を添加した。37°C に保温した 5% CO₂ 存在下のインキュベーターで 3 時間反応した後、培地中に放出されるグリセロールの量を free glycerol determination kit (シグマアルドリッチジャパン)を用いて製品添付のプロトコルに従って定量した。

5) 薬物動態試験

化合物は 6-8 週齢の雄性 C57/B16 マウスへ 10 mg/kg (methylcellulose, 0.5% w/v aq.) で腹腔内投与した。一定時間後、マウスを二酸化炭素吸収により安楽死させ、血液サンプルを心臓穿刺により回収した。血液サンプルは 22,000 g で 4°C で 5 分間遠心分離し、Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS) [Triple Quad 5500 (AB SCIEX)] で化合物を定量した。

6) *in vivo* における脂肪分解抑制作用

実験には 12 時間の明暗サイクル(午前 7 時点灯、午後 7 時 消灯)で飼育した 9 週齢の雄性 C57/B16 マウスを用いた。100 mg/kg の AT2、100 mg/kg のニコチン酸及び vehicle (10 ml/kg; 1% tween; 99% methylcellulose (0.5% w/v aq.)) を腹腔内投与した。15 分後、マウスを二酸化炭素吸収により安楽死させ、血液サンプルを心臓穿刺により回収した。血液サンプルは 22,000 g で 4°C で 5 分間遠心分離し、-80°C で保存した。遊離脂肪酸含量は nonesterified fatty acid (NEFA)-C kit (和光純薬)を用い、製品添付のプロトコルに従って定量した。

7) *in vivo* における皮膚紅潮作用

雄性 C57/B16 マウスを pentobarbitone (50 mg/kg, i.p.) で麻酔した。麻酔深度は全実験を通じて測定、記録した。化合物投与のためにカテーテルを腹腔に挿入した後、右耳を裏表にひっくり返して側部を外側に出し、測定の間耳が動かないように固定した。血流測定はレーザードップラー血流装置(Periscan PIM 2, Periscan, Stockholm, Sweden)を用いて行った。ベースラインが安定した後、100 mg/kg の AT2、200 mg/kg のニコチン酸及び vehicle

(10 ml/kg; 1% tween; 99% methylcellulose (0.5% w/v aq.))をカテーテルで投与した。測定はニコチン酸では 10 分以上、AT2 では 15 分以上実施した。皮膚紅潮を起こさなかったマウスについては、200 mg/kg のニコチン酸を投与し、皮膚紅潮を起こすことを確認した。マウスは実験終了後屠殺した。全ての実験は、UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 の規定に基づいて、共同研究先の Takeda Cambridge で行われた。

8) データ解析

HTRF cAMP assay のデータ解析は GraphPad Prism5 software (GraphPad, San Diego, CA)を用いて行った。GPR81 は L-乳酸ナトリウムの最大活性を 100%、GPR109a はニコチン酸の最大活性を 100%とし、相対活性を算出後、sigmoidal dose-response の式にフィッティングすることで濃度依存曲線を作成した。P 値<0.05 を統計学的に有意であると判定した。

第二章

MCHR1拮抗薬MQ1の阻害様式に関する研究

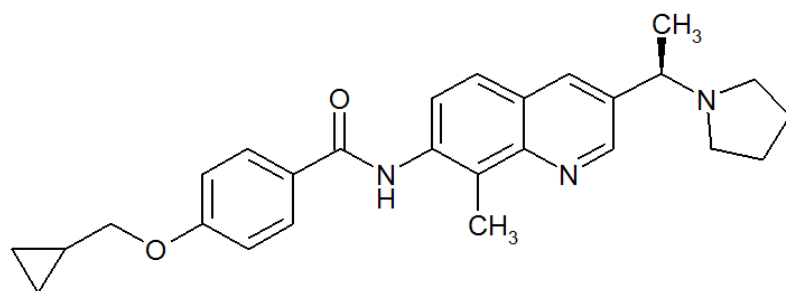
2-1 緒言

肥満は、「脂肪が過剰に蓄積した状態」と定義され、全世界でおよそ4億人が罹患しているとされる(64)。肥満は2型糖尿病、高血圧、うつ病、睡眠障害、心臓発作、脳卒中など種々の疾病を併発するために莫大な医療的、経済的負担を引き起こすことから、深刻な社会問題となっている(65)。これまでに製薬業界を中心に抗肥満薬開発に向けた研究開発活動がさかんに行われてきたが、現在使用可能な抗肥満薬の数は限られており、肥満は依然としてアンメットメディカルニーズの大きい疾患領域である(66)。

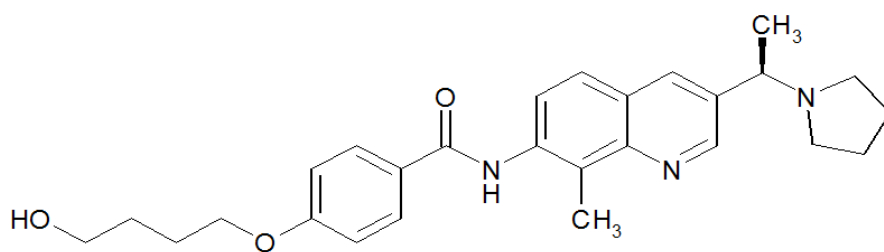
神経ペプチドの一つであるメラニン凝集ホルモン(Melanin Concentrating Hormone; MCH)は、主に視床下部に発現しており、MCHを脳内投与すると摂食行動が亢進することなどから、摂食、エネルギー代謝調節及び体重の増減に関与することが知られている(67-74)。

MCHの受容体の一つであるMCHR1はSLC-1 (somatostatin-like receptor 1)として複数のグループによって同定された(75-78)。MCHR1はGPCRに属し、海馬、側坐核、視床下部等の中樞神経系に発現している(79)。MCHR1はMCHに応答して、細胞内cAMP量を抑制すると同時にカルシウム流入を惹起する働きがあることから、 $G\alpha_i$ や $G\alpha_q$ などの複数のGタンパク質と共役することが示唆されている(75,77,79,80)。MCHR1欠損マウスを用いた機能解析結果からMCHR1は摂食、エネルギー消費に関わることが明らかとなっている(81,82)。こうした知見からMCHR1は抗肥満薬の有望な標的分子と考えられており、現在までにピペラジン系(Neurogen社)、ピフェニルカルボキサミド系(GlaxoSmithKline社)、チエノピリミジノン系(GlaxoSmithKline社)、インダゾール系(Abott社)、テトラゾール系(Amgen社)など多数の低分子MCHR1拮抗薬が報告され、そのうちピペラジン系やチエノピリミジノン系など一部の化合物ではヒトを対象とした臨床試験も実施された(83-85)。しかしその一方で、現在までにMCHR1拮抗薬として承認された薬剤は一つも無く、その原因の一端は、MCHR1拮抗薬によるMCHR1阻害の分子メカニズムが明らかになっていない点が多いためだと考えられる。武田薬品工業株式会社では、肥満治療のためのMCHR1拮抗薬を創出すべくHTS及び最適化研究を実施し、リード化合物MQ1(86)(図2-1)を創出した。

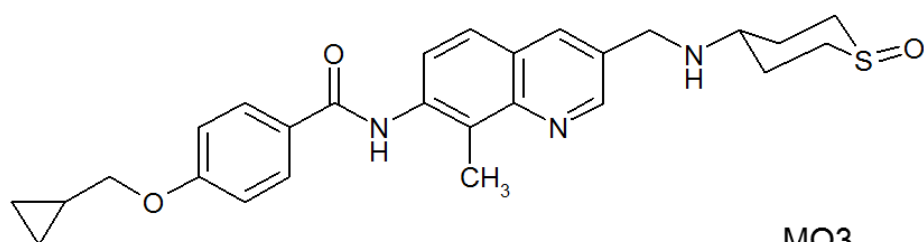
第二章ではMQ1によるMCHR1阻害の分子メカニズムを明らかにし、MCHR1拮抗薬創出の一助とすべく、MCHR1阻害様式の詳細な解析を行った。本章では、MQ1のアロステリックモジュレーターとしての性質、MCHR1が伝達する様々なシグナル経路の阻害、時間依存的な阻害活性増強等、MQ1のMCHR1阻害の分子メカニズムについて述べる。



MQ1



MQ2



MQ3

図 2-1 MCHR1 拮抗薬の化学構造式

2-2 結果

2-2-1) MQ1 が MCHR1 の各種シグナル経路に与える影響

武田薬品工業株式会社で実施されたHTS及び最適化研究によって、MCHR1拮抗薬のリード化合物としてMQ1が創出された(86)。そこで、細胞フリーの結合試験系及びMCHR1安定発現細胞を構築し、MQ1の結合活性並びにMCHR1のシグナル経路に対する阻害活性を調べた。 $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ を用いた結合試験系において、MQ1は $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ のヒトMCHR1膜画分に対する結合を $2.2 \pm 0.036 \text{ nM}$ の IC_{50} 値で阻害した(表2-1)。続いてヒトMCHR1を安定発現させた細胞を用いて、MQ1がMCHR1のシグナル経路に与える影響を調べた。MCHR1は $\text{G}\alpha_i$ 、 $\text{G}\alpha_o$ 及び $\text{G}\alpha_q$ などの複数のGタンパク質と共役することが知られている(80)。そこでMCHによって活性化される $\text{G}\alpha_i$ 及び $\text{G}\alpha_q$ タンパク質の作用、すなわち細胞内のcAMP量抑制及び細胞内カルシウム流入を検出する評価系を構築した。細胞内cAMP濃度測定系において、MCHは $1.8 \pm 0.93 \text{ nM}$ の EC_{50} 値で細胞内cAMP量を濃度依存的に抑制し、その際のMQ1の IC_{50} 値は $5.7 \pm 1.7 \text{ nM}$ であった(図2-2)。一方、細胞内カルシウムフラックス測定系においては、MCHの EC_{50} 値は $0.70 \pm 0.086 \text{ nM}$ であり、MQ1の IC_{50} 値は $30.6 \pm 6.7 \text{ nM}$ であった(表2-1)。細胞内カルシウムフラックスの波形を図2-3に示した。

一般的に活性化されたGPCRはGRKによるリン酸化を受け、リン酸化されたGPCRは足場タンパク質である β -アレスチンのリクルートを惹起する。GPCRにリクルートされた β -アレスチンは各種キナーゼの活性化や転写制御などを介して様々な生理機能に関与することが報告されている(30)。そこでMQ1の β -アレスチンシグナルに与える影響を調べるために、PathHunter β -arrestin assay (DiscoverRx, Fremont, CA)を用いて β -アレスチンシグナル測定系を構築した。この測定系はenzyme fragment complementation法の原理に基づいている。すなわち、リガンドの結合によって β -アレスチンがリクルートされると、GPCRのC末端側に結合した β -ガラクトシダーゼの一部のコンポーネントと、 β -アレスチンに付加された β -ガラクトシダーゼの残りのコンポーネントとが再構成されて活性型酵素となり、再構成された β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定することで、GPCRと β -アレスチンの相互作用を検出する(87)。本測定系で、MCHは $2.5 \pm 0.3 \text{ nM}$ の EC_{50} 値で β -アレスチンをリクルートし、MQ1は $1.7 \pm 0.14 \text{ nM}$ の IC_{50} 値でMCHによって引き起こされる β -アレスチンのリクルートを阻害した(表2-1)。これらの結果から、MQ1はMCHR1安定発現細胞において、 $\text{G}\alpha_i$ 、 $\text{G}\alpha_q$ 及び β -アレスチンを介した複数のシグナル経路を阻害することが明らかとなった。

2-2-2) MQ1 の時間依存的な阻害作用

2-2-1)で述べたように、細胞内カルシウムフラックス測定系におけるMQ1の阻害の IC_{50} 値($30.6 \pm 6.7 \text{ nM}$)は、 $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ を用いた結合試験系($2.2 \pm 0.036 \text{ nM}$)、細胞内cAMP濃度測定系($5.7 \pm 1.7 \text{ nM}$)及び β -アレスチンシグナル測定系($1.7 \pm 0.14 \text{ nM}$)のそれらと比較し、それぞれ5倍、14倍、18倍程度弱く検出された。細胞内カルシウムフラックス測定系

表 2-1 各種評価系における MCH の K_d 及び EC_{50} 値ならびに MCHR1 拮抗薬の IC_{50} 値

| 評価系 | K_d value (nM) | MCH EC_{50} (nM) | MQ1 IC_{50} (nM) | MQ2 IC_{50} (nM) | MQ3 IC_{50} (nM) |
|--|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| [¹²⁵ I]MCH-(4-19) 結合試験 ¹⁾ (1時間反応) | - | - | 2.2 ± 0.036 | 45 ± 13 | 16 ± 3.6 |
| [¹²⁵ I]MCH-(4-19) 結合試験 ²⁾ (8時間反応) | - | - | 0.32 ± 0.034 | 32 ± 6.4 | 11 ± 2.2 |
| 結合親和性 ³⁾ | 0.057 ± 0.012 | - | 0.16 | 11 | 5.6 |
| cAMP濃度測定系 ⁴⁾ | - | 1.8 ± 0.93 | 5.7 ± 1.7 | 45 ± 32 | 27 ± 12 |
| カルシウム フラックス測定系 ⁵⁾ | - | 0.70 ± 0.086 | 30.6 ± 6.7 | 230 ± 20 | 64 ± 5.4 |
| β-アレスチン シグナル測定系 ⁶⁾ | - | 2.5 ± 0.3 | 1.7 ± 0.14 | 53 ± 14 | 6.8 ± 1.4 |

表中 1)~6)の試験方法を以下に記す。

1,2) [¹²⁵I]MCH-(4-19)を用いた結合試験は実験方法の項で記載の通りに実施し、1)は1時間、2)は8時間反応した。3) 結合親和性は $IC_{50} = K_1 ([A] + K_d) / (\alpha [A] + K_d)$ の式で算出した。4,5,6) 実験方法の項で記載の通りに実施し、細胞内 cAMP 濃度測定系、細胞内カルシウムフラックス測定系及びβ-アレスチンシグナル測定系の MCH 濃度はそれぞれ 5 nM、5 nM 及び 10 nM に設定した。mean ± SEM 1,2)は duplicate、それ以外は quadruplicate。

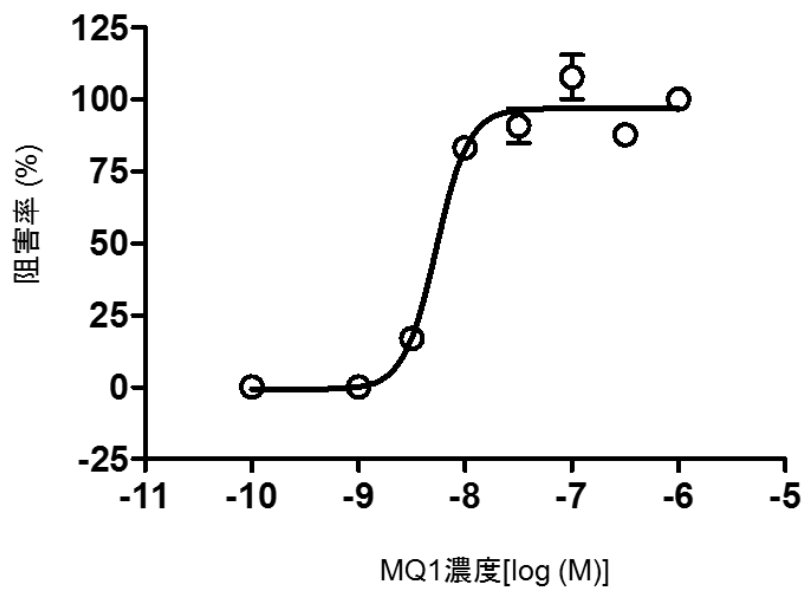
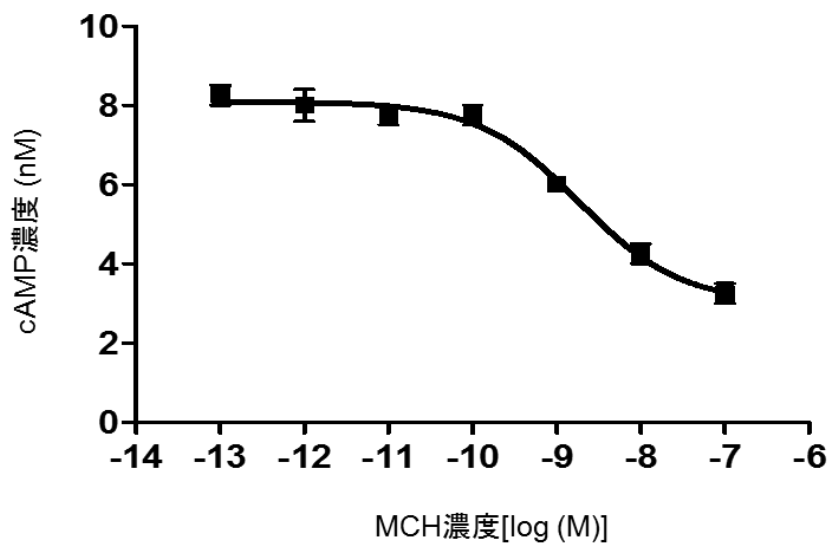


図 2-2 細胞内 cAMP 濃度測定系を用いた活性測定

(A) MCH の MCHR1 に対する活性化作用及び、(B) MQ1 の阻害作用を、細胞内 cAMP 濃度測定系を用いて測定した。mean \pm SEM (quadruplicate)。

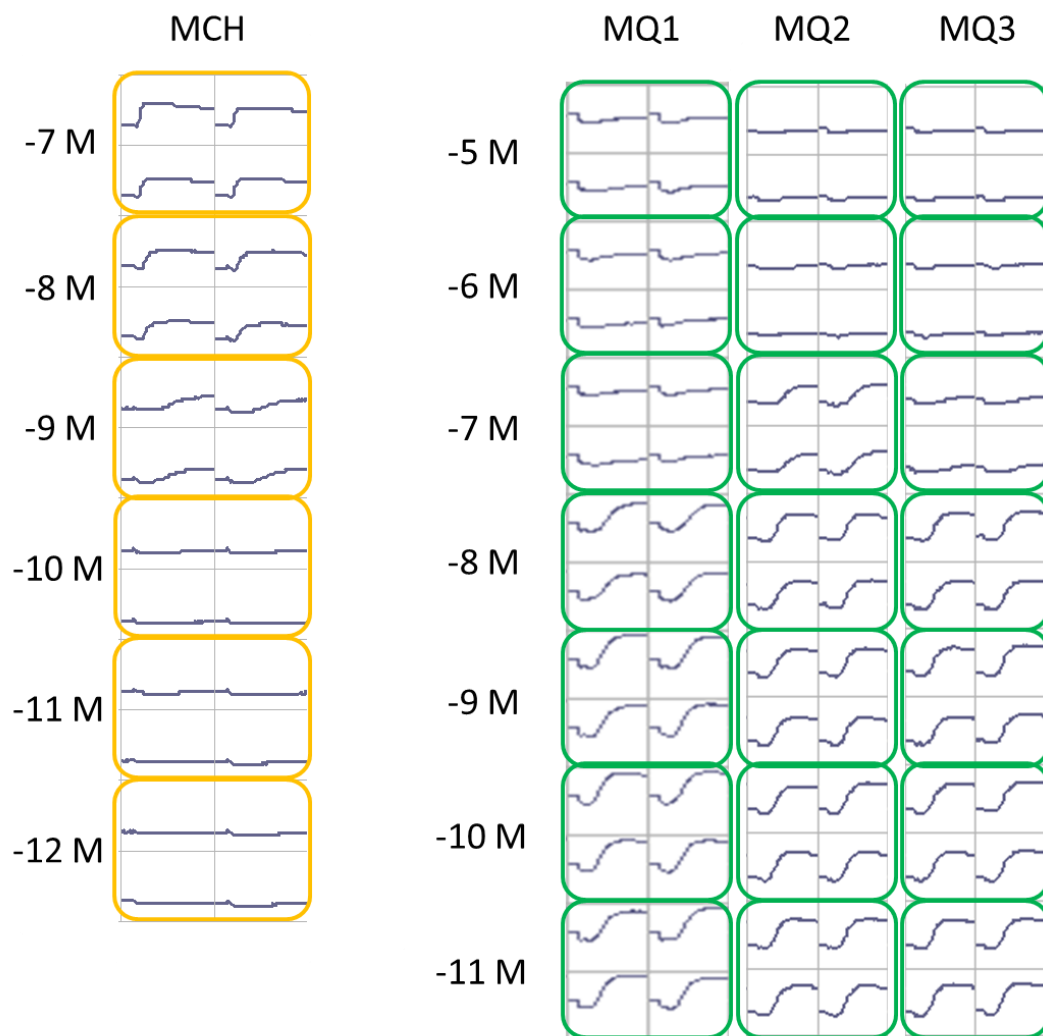


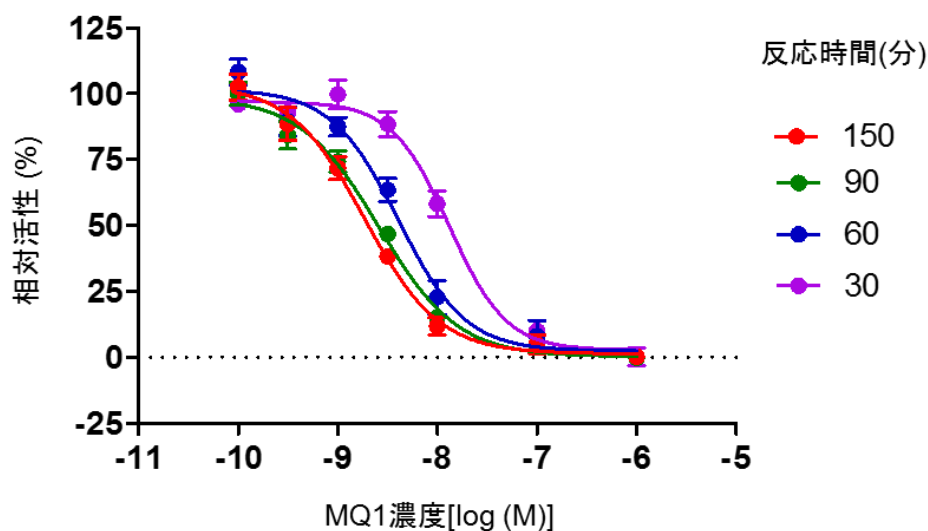
図 2-3 細胞内カルシウムフラックスの波形
 MCH による細胞内カルシウム流入及び、拮抗薬による阻害の様子を示した。

は細胞内で引き起こされるカルシウムフラックスをリアルタイムで検出する系である一方、 $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ を用いた結合試験や細胞内 cAMP 濃度の測定、或いは β -アレスチンシグナルの測定は、十分な反応時間の下で行われた。そこで MQ1 の時間依存的な活性増強の可能性を検証するために、異なる反応時間における MQ1 の β -アレスチンシグナル阻害活性を調べた。その結果、反応時間を伸ばすにつれて、MQ1 の阻害活性は増強した。30 分の反応時間では MQ1 の IC_{50} 値は $14 \pm 2.6 \text{ nM}$ であるのに対し、反応時間を 60 分、90 分及び 150 分に伸ばすことで、阻害活性はそれぞれ $4.1 \pm 0.83 \text{ nM}$ 、 $2.6 \pm 0.42 \text{ nM}$ 及び $1.9 \pm 0.33 \text{ nM}$ に向上した(図 2-4A)。続いて、 $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ を用いた結合試験で MQ1 の時間依存的な作用を同様の方法で調べた。30 分の反応時間では MQ1 の IC_{50} 値は $2.5 \pm 0.53 \text{ nM}$ であるのに対し、反応時間を 60 分、90 分及び 150 分に伸ばすことで、活性はそれぞれ $1.0 \pm 0.41 \text{ nM}$ 、 $0.57 \pm 0.12 \text{ nM}$ 及び $0.39 \pm 0.073 \text{ nM}$ に向上した(図 2-4B)。以上の結果より、MQ1 は時間依存性のある MCHR1 拮抗薬であることが示された。続いて MQ1 の構造類縁体である MQ2 及び MQ3(図 2-1)について、各種測定系における阻害活性を調べ、その結果を表 2-1 に示した。MQ1 と同様に、MQ2 及び MQ3 も、細胞内カルシウムフラックス測定系における阻害活性が、他の 3 種類の測定系($[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ を用いた結合試験系、細胞内 cAMP 濃度測定系、 β -アレスチンシグナル測定系)よりも弱く検出される傾向が認められた。しかし、MQ2 及び MQ3 における細胞内カルシウムフラックス測定系と他の測定系の活性の乖離は最大で 5.1 倍及び 9.4 倍であり、その乖離の程度は MQ1 よりも弱いことが示唆された。更に $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ を用いた結合試験系で、反応時間 1 時間または 8 時間で評価した結果、MQ2 及び MQ3 いずれも活性に変化は認められなかったことから(図 2-5)、MQ2 及び MQ3 は MQ1 と比較すると時間依存性の低い化合物であると考えられた。そこで以降の実験では、時間依存性の高い MQ1 に対して、時間依存性の低い対照化合物として MQ2 及び MQ3 を使用することとした。

2-2-3) MQ1 の可逆性評価

MQ1 は時間依存的な作用を示すことから、本化合物は共有結合を介した不可逆的阻害剤である可能性が考えられる。そこでこの可能性を検証するために、Affinity Selection Mass Spectrometry (ASMS)を用いた MCHR1 膜画分に対する結合試験系を構築した。本試験系では、MCHR1 膜画分と化合物を反応後、反応液をゲル濾過に供することで MCHR1 膜画分に結合していないフリーの化合物を除去した。更に、化合物/膜画分複合体を含む溶出サンプルにアセトニトリルを加えて膜画分を変性させることで、化合物を膜画分から解離させ、解離した化合物を LC/MS/MS で定量した。MQ1 の MCHR1 に対する特異的結合量を算出するためには、全結合量から MCHR1 膜画分に対する非特異的結合量を差し引く必要がある。そこで MQ1 の構造類縁体であり、 $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ を用いた結合試験系で $45 \pm 13 \text{ nM}$ の阻害活性を有する MQ2 (表 2-1)を過剰量添加することで、MQ1 の MCHR1 膜画分に対する非特異的結合量を測定した。その結果、図 2-6 の赤いラインで示される通り、MQ1

A



B

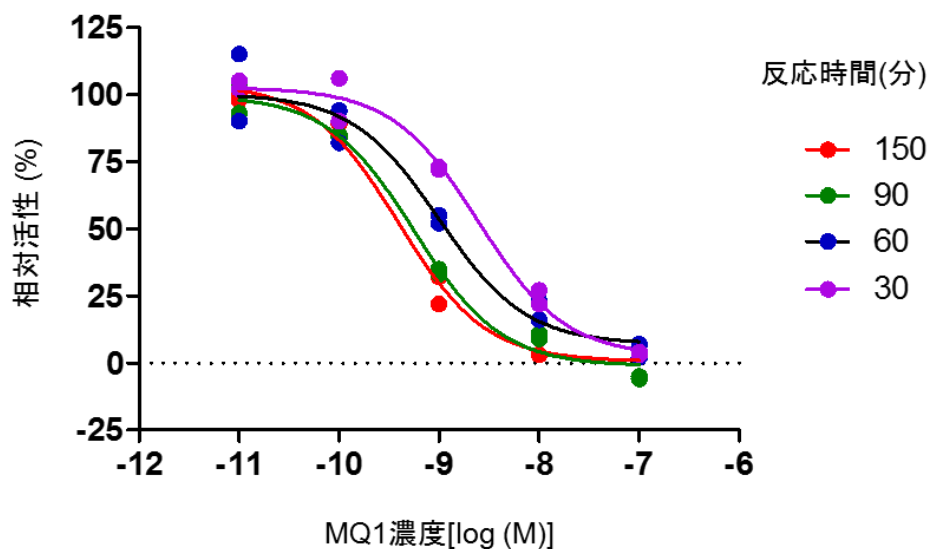
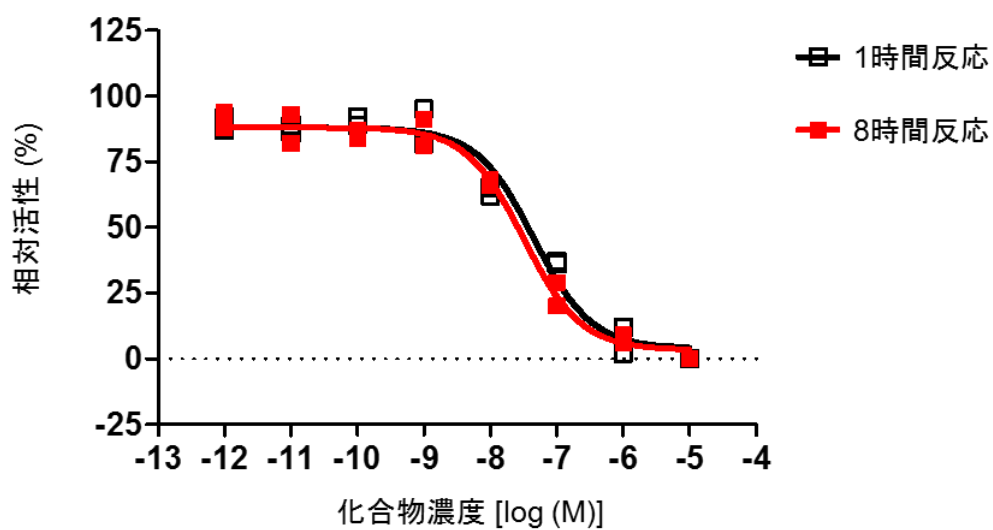


図 2-4 MQ1 の時間依存的な阻害活性

(A) MQ1 の時間依存的な阻害活性を β -アレスチンシグナル測定系で調べた。ヒト MCHR1 安定発現細胞と MQ1 及び MCH (10 nM)を 30 分、60 分、90 分及び 150 分間反応した。mean \pm SEM (quadruplicate)。 (B) MQ1 の時間依存的な阻害活性を [¹²⁵I]MCH-(4-19)を用いた結合試験系で調べた。ヒト MCHR1 膜面分と MQ1 及び [¹²⁵I]MCH-(4-19) (50 pM)を 30 分、60 分、90 分及び 150 分間反応した。全てのデータポイント(duplicate)を記載した。

A



B

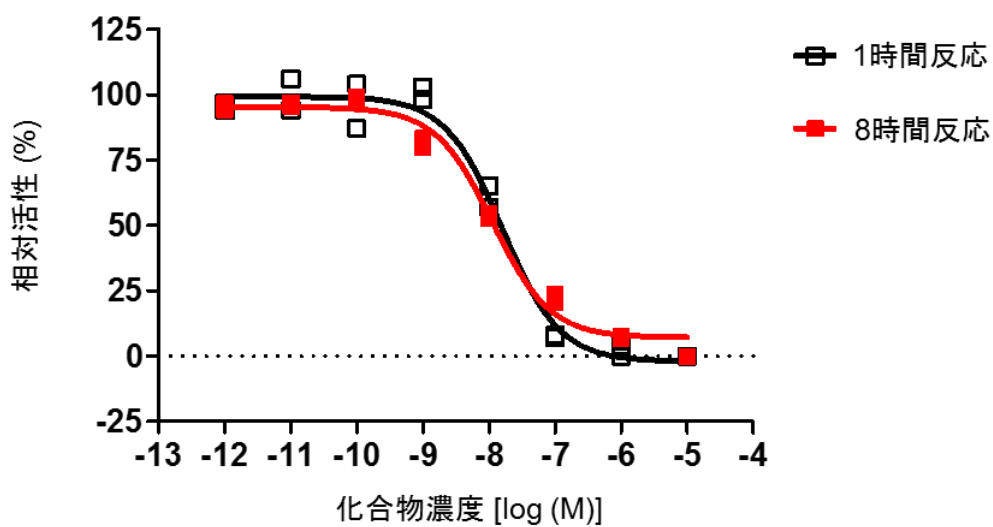


図 2-5 MCHR1 拮抗薬 MQ2 及び MQ3 の阻害活性

反応時間 1 時間(□)及び 8 時間(■)における(A) MQ2 と(B) MQ3 の濃度依存的な阻害作用を [¹²⁵I]MCH-(4-19)を用いた結合試験系で調べた。全てのデータポイント(duplicate)を記載した。

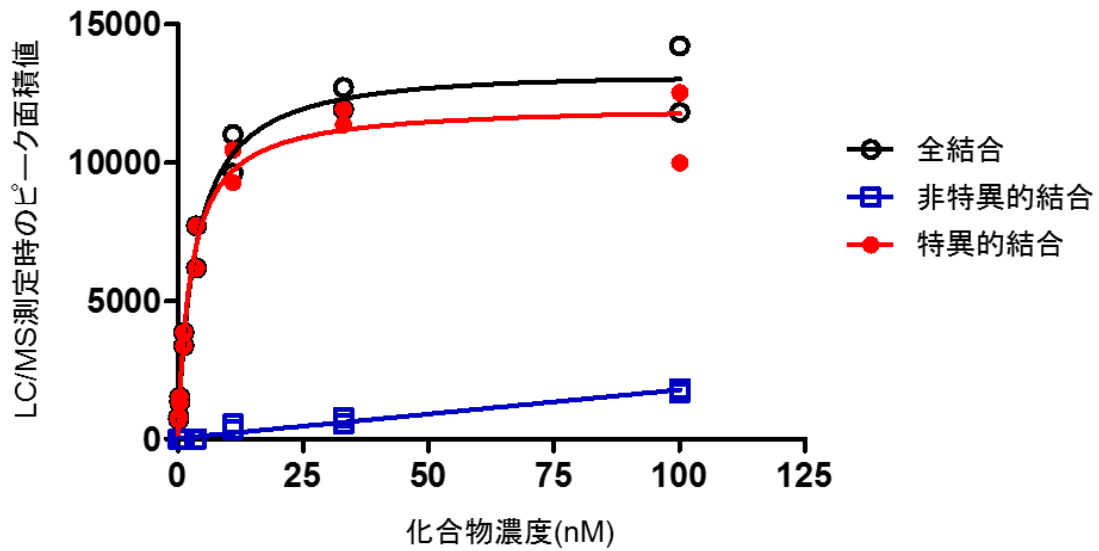


図 2-6 ASMS を用いた MQ1 の MCHR1 への結合の確認

ヒト MCHR1 膜画分と MQ1 を、30 μ M の MQ2 存在下(\square)または非存在下(\circ)で 210 分間反応させた。MQ1 の特異的結合(\bullet)は、MQ2 非存在下の全結合から過剰量の MQ2 存在下の非特異的結合を差し引いた値として算出した。全てのデータポイント(duplicate)を記載した。

は MCHR1 膜画分に対して特異的な結合をしていることが示された。MQ1 が共有結合を介して不可逆的に結合した場合は、アセトニトリル添加で膜画分を変性させても、化合物はタンパク質から解離しない。従って、上記実験で MQ1 の特異的結合が確認された事実は、MQ1 の MCHR1 への可逆的結合を示唆するものであると考えられた。

2-2-4) MQ1 の阻害作用にウォッシュアウトが与える影響

時間依存的な可逆的阻害は、一般的に化合物の受容体からの解離速度が遅いことに起因すると考えられる(88)。そこでこの仮説を検証すべく、 β -アレスチンシグナル測定系を用いて、ウォッシュアウト実験を行った。本ウォッシュアウト実験では、化合物と MCHR1 安定発現細胞を 2 時間反応後、PBS で細胞をウォッシュアウトすることで反応系中のフリーの化合物を除去した。一定時間後 MCH を添加することで、その時点で MCHR1 に結合している化合物による阻害活性を β -アレスチンシグナル測定系で評価した。まず予備検討として、MQ1 または MQ2 と MCHR1 安定発現細胞を反応後、ウォッシュアウト無しで、化合物の阻害活性を測定した。その結果、図 2-7A 及び B の黒いラインで示されるように、MCH によって引き起こされる β -アレスチンのリクルートが濃度依存的に阻害されることを確認した。続いて、MCH 添加の直前に 2 回のウォッシュアウトを行い、同様の実験を行った。その結果、MQ1 の阻害活性はウォッシュアウト無しでは 1.3 ± 0.13 nM であるのに対し、ウォッシュアウト有りでは 2.1 ± 0.72 nM で、大きな変化は認められず、ウォッシュアウト後も阻害活性は維持されることが示された(図 2-7A)。一方で、 $[^{125}\text{I}]\text{MCH}$ -(4-19)を用いた結合試験等から時間依存性が低いことが示唆された MQ2 (図 2-1, 2-5A)の場合は、ウォッシュアウト無しでの阻害活性が 74 ± 12 nM であるのに対し、ウォッシュアウト有りでの阻害活性は 3900 ± 2500 nM と、大きく減弱した(図 2-7B)。以上の結果より、MQ1 の時間依存性は解離速度の遅さに起因することが示唆された。

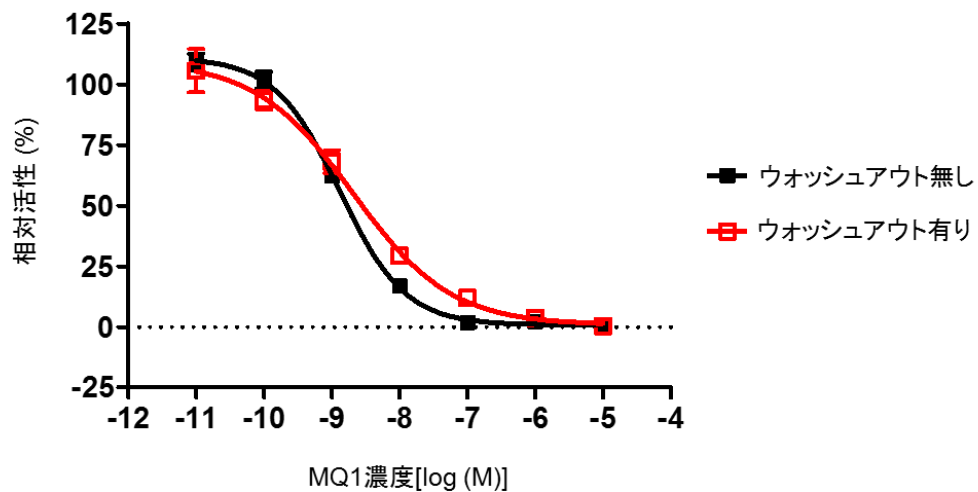
2-2-5) MQ1 の速度論的解析

MQ1 の受容体からの解離速度を調べるために、ASMS を用いた結合試験を使って速度論的解析を実施した。MQ1 と MCHR1 膜画分を反応した後、MQ1 の構造類縁体を過剰量加えることで、MQ1 の受容体からの解離の時間変化を調べた。構造類縁体には、結合試験で 16 ± 3.6 nM の阻害活性を示し、時間依存性が低い MQ3 を使用した(図 2-1, 2-5B)。図 2-8 に示す通り、MQ1 はゆっくりと MCHR1 膜画分から解離し、その解離速度定数は 0.53 ± 0.024 h⁻¹であった。対照的に、ウォッシュアウト実験で著しい活性減弱が認められた MQ2 の解離は比較的早く、その解離速度定数は 2.6 ± 0.2 h⁻¹であった。以上より、上記ウォッシュアウト実験と矛盾しない結果が速度論的解析から得られた。

2-2-6) MQ1 の阻害様式

続いて MQ1 の阻害様式を調べるために、MQ1 が MCH の濃度依存曲線に与える影響を

A



B

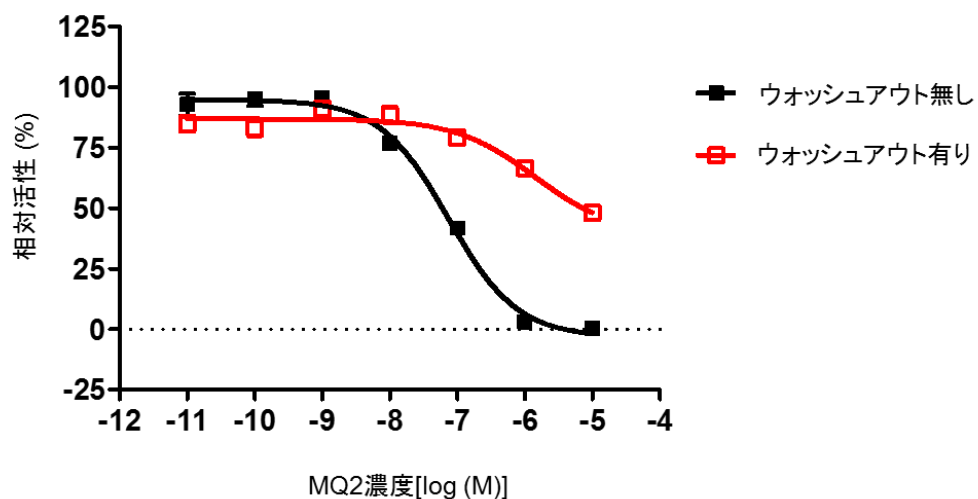


図 2-7 MCHR1 拮抗薬の阻害活性にウォッシュアウトが及ぼす影響

ヒト MCHR1 安定発現細胞と、0.1% BSA 含有 Opti-MEM で溶解させた(A) MQ1 または (B) MQ2 を 2 時間反応した。化合物を含む Opti-MEM 培地を除去し、50 μ l の PBS で 2 回細胞を洗浄した。その後、細胞は 10 nM の MCH で刺激し、化合物の阻害活性を β -アレチンシグナル測定系で調べた。mean \pm SEM (quadruplicate)。

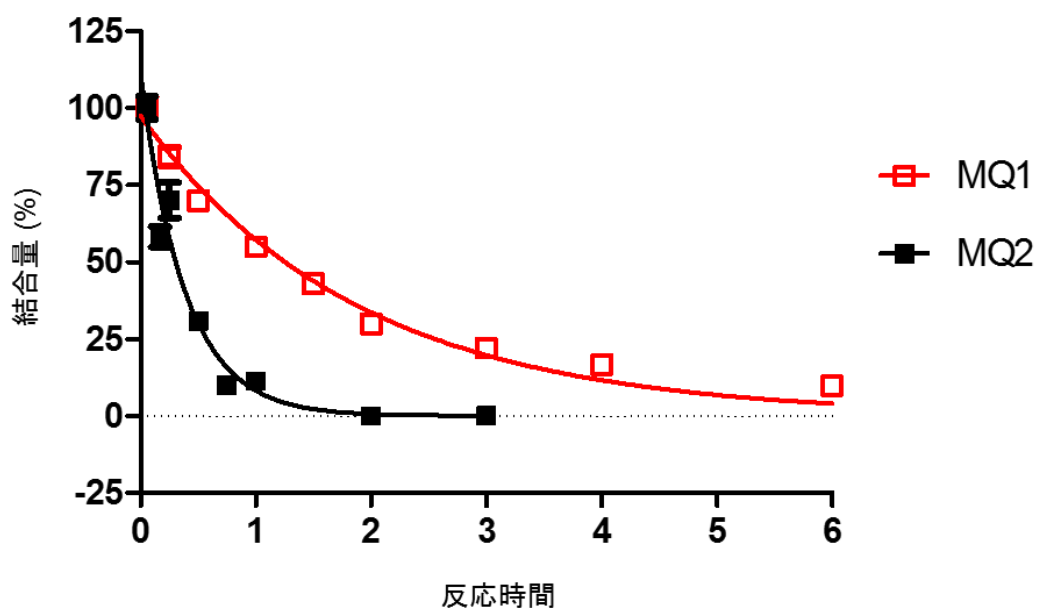


図 2-8 MCHR1 拮抗薬の速度論的解析

MQ1 (□) 及び MQ2 (■) をヒト MCHR1 膜画分と結合させた後、過剰量の構造類縁体 MQ3 を添加し、一定時間後の結合量を ASMS を用いて測定した。ヒト MCHR1 膜画分と結合させた後の最初の結合シグナルを 100%、MQ3 によって完全に置換された際のシグナルを 0% とし、一定時間後の相対的な結合量をプロットした。mean ± SEM (sextuplicate)。

β -アレスチンシグナル測定系で調べた。MQ1 は時間依存性があるので、評価は反応系が平衡に達した状態で行う必要がある。そこでまず、MCH の MQ1 存在下での EC₅₀ 値の時間変化を調べた。その結果、異なる MQ1 濃度における MCH の EC₅₀ 値は、反応時間 4 時間と 8 時間の間で統計学的に差がないことが明らかとなり、反応系は 4 時間で平衡に達していることが示唆された(表 2-2)。更に、10 nM 及び 100 nM の MCH 存在下における MQ1 の阻害活性の時間変化を調べ、IC₅₀ 値が 4 時間を過ぎると一定になることを確認した(図 2-9)。以上の結果より、反応系は 4 時間で平衡に達することが予想されたので、確実に平衡状態で行うために本試験の反応時間は 8 時間に設定した。MCH の濃度依存曲線は、MQ1 の濃度を上げるに従って、右側にシフトすると共に、薬物の最大活性を表す E_{max} が低下する insurmountable な阻害様式を示した(図 2-10A、表 2-3)。また、時間依存性が低い MQ2 を用いて同様の実験を実施したところ、MQ1 と同様の傾向が認められた(図 2-10B、表 2-3)。MCH の E_{max} の低下が評価化合物の細胞傷害性に起因する可能性を調べるために、MQ1 及び MQ2 と 8 時間反応後の細胞の生存率を CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability assay (プロメガ)を用いて評価した。その結果、細胞の生存率に変化は無く、両化合物は細胞傷害性を有していないことが示された(data not shown)。

MQ1 や MQ2 が MCH と同じサイトに結合する場合、すなわち競合的拮抗薬として挙動する場合、MCH の濃度を十分に上げると、MCHR1 に結合している MQ1 や MQ2 は最終的には MCH に置換されるため、E_{max} は 100%まで到達することが予想される。しかし本実験では、MCH 濃度を上げても E_{max} は 100%に到達することなく低下する傾向が認められた。この結果は MQ1 や MQ2 が競合的拮抗薬ではないこと、すなわちアロステリックサイトに結合するアロステリックモジュレーターであることを示唆するものと考えられる。実際に、MCH と同じサイトに結合することが予測されるペプチド性の拮抗薬 [Gva (5-guanidinovaleric acid)-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Ava (aminovaleric acid)-Cys-NH₂, disulfide bond between Cys²-Cys¹⁰]を用いて同様の実験を行ったところ、MQ1 や MQ2 とは対照的に、E_{max} の低下は認められず、MCH の濃度依存曲線は右側へ平衡移動した(図 2-10C、表 2-3)。以上の結果より、ペプチド拮抗薬はオルソステリックサイトに作用する競合的拮抗薬である可能性が示唆された。

続いて、この MQ1 及び MQ2 の阻害作用が β -アレスチンシグナル測定系に特異的なアーティファクトで無いことを確認するために、同様の実験を細胞内 cAMP 濃度測定系を用いて実施した。その結果、 β -アレスチンシグナル測定系の結果と同様に、MQ1 及び MQ2 は MCH の濃度依存曲線を右側へシフトすると共に E_{max} を低下させ、insurmountable な阻害様式を示した(図 2-11、表 2-4)。以上の結果より、上記と同様の理由で、MQ1 及び MQ2 はネガティブアロステリックモジュレーターとして作用することが示唆された。

2-2-7) [¹²⁵I]MCH-(4-19)と MCHR1 の相互作用に MQ1 が与える影響

アロステリックモジュレーターの特徴の一つは、受容体の構造変化を引き起こすことで、

表 2-2 異なる反応時間及び MQ1 濃度における MCH の pEC₅₀ 値

| 反応時間 | MQ1濃度 (nM) | | | | | |
|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | 0 | 1 | 10 | 100 | 300 | 1000 |
| 4時間 | 8.7 ± 0.069 | 8.3 ± 0.059 | 7.6 ± 0.060 | 6.9 ± 0.097 | 6.4 ± 0.068 | 6.0 ± 0.11 |
| 8時間 | 8.6 ± 0.066 | 8.4 ± 0.057 | 7.6 ± 0.072 | 6.8 ± 0.084 | 6.5 ± 0.074 | 5.8 ± 0.16 |

反応時間 4 時間及び 8 時間における MCH の MQ1 存在下での EC₅₀ 値をβ-アレスチンシグナル測定系で調べた。mean ± SEM (quadruplicate)。 (反応時間 4 時間との比較、unpaired *t*-test を用いた統計解析で有意差なし、*p* > 0.05)

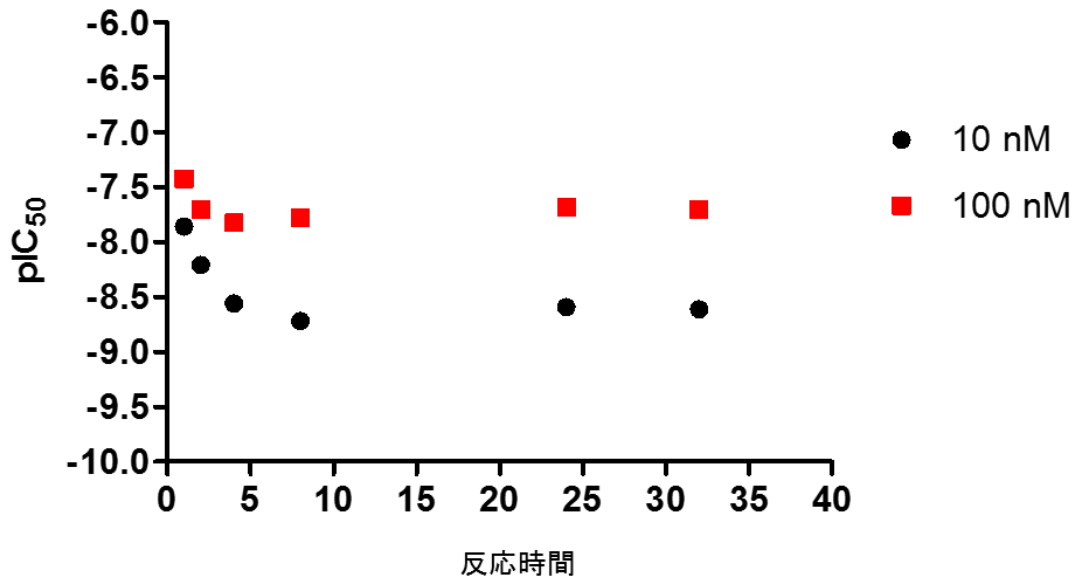


図 2-9 MQ1 の阻害活性(pIC₅₀)の時間変化

ヒト MCHR1 安定発現細胞と MQ1 及び 10 nM または 100 nM の MCH を反応し、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、24 時間及び 32 時間後の阻害活性(pIC₅₀)をβ-アレチンシグナル測定系で調べた(quadruplicate)。

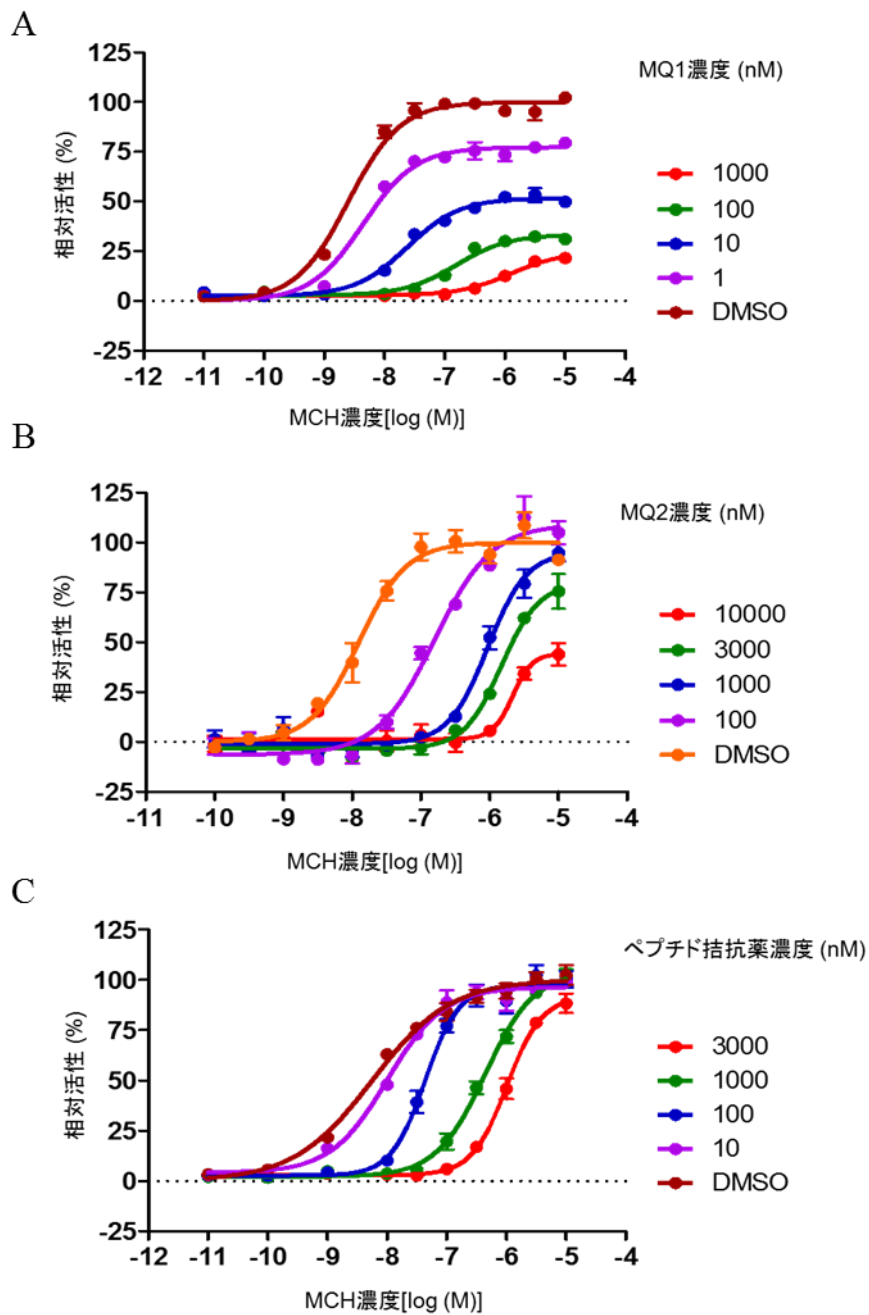


図 2-10 MCHR1 拮抗薬が β -アレスチンシグナルにおける MCH の濃度依存活性に及ぼす影響

異なる濃度の(A) MQ1、(B) MQ2 及び(C)ペプチド拮抗薬[Gva (5-guanidinovaleric acid)-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Ava (aminovaleric acid)-Cys-NH₂, disulfide bond between Cys²-Cys¹⁰] 存在下における MCH の濃度依存活性を β -アレスチンシグナル測定系で調べた。MCHR1 拮抗薬非存在下における MCH の最大活性を 100%として、各濃度における相対値をプロットした。mean \pm SEM (quadruplicate)。

表 2-3 β -アレスチンシグナル測定系における各種 MCHR1 拮抗薬存在下での MCH の Emax

| 化合物 | 濃度(nM) | Emax [※] |
|---------|--------|-------------------------|
| MQ1 | 1 | 77 ± 1.2 ^{***} |
| | 10 | 52 ± 1.0 ^{***} |
| | 100 | 33 ± 1.0 ^{***} |
| | 1000 | 24 ± 1.1 ^{***} |
| MQ2 | 100 | 109 ± 4.6 |
| | 1000 | 95 ± 5.3 |
| | 3000 | 80 ± 5.5 |
| | 10000 | 44 ± 4.9 ^{***} |
| ペプチド拮抗薬 | 10 | 96 ± 1.9 |
| | 100 | 98 ± 2.2 |
| | 1000 | 104 ± 3.2 |
| | 3000 | 92 ± 3.2 |

※ 拮抗薬非存在下での MCH の最大活性を 100 とした際の、各化合物存在下での MCH の最大活性の相対値

MQ1、MQ2 及びペプチド拮抗薬存在下における MCH の Emax 値を β -アレスチンシグナル測定系で調べた。mean ± SEM (quadruplicate)。***: $P < 0.001$ (対照 Emax 値との比較、統計解析は ANOVA with Dunnett's test)

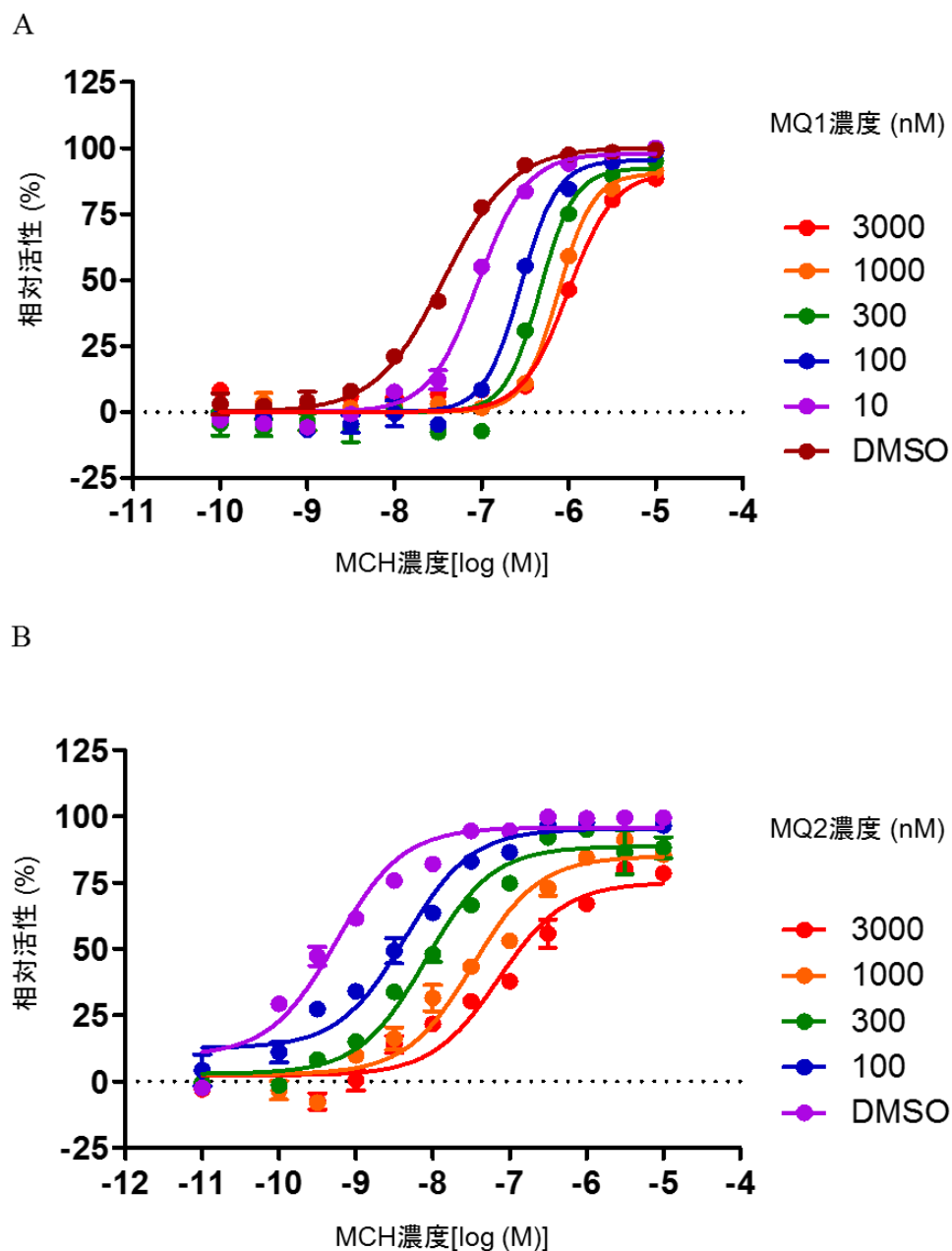


図 2-11 MCHR1 拮抗薬が cAMP シグナルにおける MCH の濃度依存活性に及ぼす影響
異なる濃度の(A) MQ1 及び(B) MQ2 存在下における MCH の濃度依存活性を細胞内 cAMP
濃度測定系で調べた。MCHR1 拮抗薬非存在下における MCH の最大活性を 100%として、
各濃度における相対値をプロットした。mean \pm SEM (quadruplicate)。

表 2-4 細胞内 cAMP 濃度測定系における各種 MCHR1 拮抗薬存在下での MCH の Emax

| 化合物 | 濃度(nM) | Emax* |
|-----|--------|--------------|
| MQ1 | 10 | 99 ± 1.8 |
| | 100 | 98 ± 1.5 |
| | 300 | 95 ± 2.6 |
| | 1000 | 92 ± 0.91** |
| | 3000 | 88 ± 0.91*** |
| MQ2 | 100 | 96 ± 1.8 |
| | 300 | 89 ± 1.9 |
| | 1000 | 85 ± 2.5** |
| | 3000 | 75 ± 0.81** |

※ 拮抗薬非存在下での MCH の最大活性を 100 とした際の、各化合物存在下での MCH の最大活性の相対値

MQ1 及び MQ2 存在下における MCH の Emax 値を細胞内 cAMP 濃度測定系で調べた。mean ± SEM (quadruplicate)。**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ (対照 Emax 値との比較、統計解析は ANOVA with Dunnett's test)

オルソステリックリガンドの受容体への結合速度または解離速度を変化させることである。そこで、MQ1 がアロステリックモジュレーターであることの更なる確証を得るために、 $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ の MCHR1 からの解離に関する速度論的解析を行った。 $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ と MCHR1 膜画分を反応した後、非標識 MCH-(4-19)を過剰量添加することで、 $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ の解離の時間変化を測定した。MCH の MCHR1 からの解離速度定数は $0.13 \pm 0.028 \text{ min}^{-1}$ であった。続いて、MCH-(4-19)と同じサイトに結合することが予想されるペプチドアナログである MCH-(1-19)を系に添加した。この時、 $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ の解離速度に影響は認められなかった(図 2-12)。一方で、MQ1 や MQ2 を添加すると、解離速度定数は有意に変化し、それぞれ $0.011 \pm 0.0031 \text{ min}^{-1}$ と $0.026 \pm 0.0064 \text{ min}^{-1}$ となった(図 2-12)。これらの結果は、MQ1 及び MQ2 が $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ の解離速度を変化させること、そして MCHR1 のアロステリックサイトに作用することを示すものである。

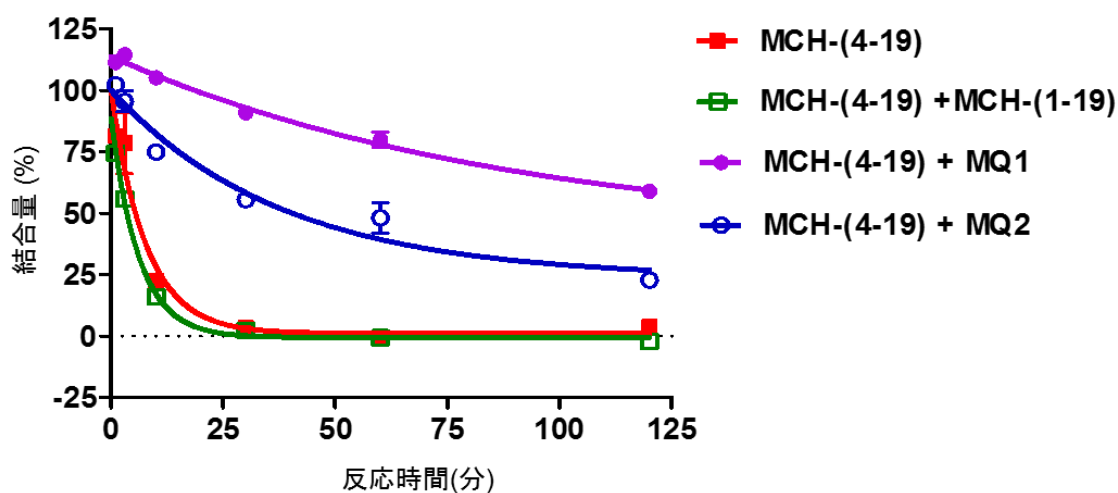


図 2-12 MCHR1 拮抗薬が $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ の解離速度に及ぼす影響

ヒト MCHR1 膜画分と 50 pM $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ を 2 時間反応させた。その後、MQ1 (●)、MQ2 (○)及び MCH-(1-19) (□)存在下または非存在下(■)で、過剰量($1 \text{ }\mu\text{M}$)の非標識 MCH-(4-19)を添加した。ヒト MCHR1 膜画分と結合させた後の最初の結合シグナルを 100%、非標識 MCH-(4-19)によって完全に置換された際のシグナルを 0%とし、一定時間後の相対的な結合量をプロットした。mean \pm SEM (triplicate)。

2-2-8) 変異導入による結合部位の推定

MQ1 が MCH とは異なるサイトに結合することをより直接的に示すために、MCHR1 のトランスメンブレン(TM)ヘリックスに部位特異的な変異導入を行った。Hollenstein らの報告(41) によれば、同じペプチド性の GPCR である corticotrophin-releasing factor receptor 1 (CRF1R)では、3 番目、5 番目及び 6 番目の TM ヘリックスがアロステリックポケットを形成していることが結晶構造情報から明らかとなっている。そこで、発現ベクター pCMV-PL/hMCHR1 を鋳型として、上記の TM ヘリックスに位置する 18 アミノ酸をそれぞれアラニンまたはバリンに変換した発現ベクターを構築した。MCHR1 のアミノ酸配列及び変異を導入したアミノ酸を図 2-13 に示した。作成した発現ベクターを β -アレスチン安定発現細胞に一過的に導入し、それぞれの変異体における MCH 及び MQ1 の活性を、 β -アレスチンシグナル測定系で調べた。Macdonald らの報告(89)でリガンドへの結合が明らかとなっている Thr²⁰⁹ 及び Gln²⁷⁶ のアラニン置換は、報告通り MCH の pEC₅₀ 値を有意に低下させたが、MQ1 の活性には影響を与えなかった(表 2-5)。その一方で、Ala¹³⁶ 及び His¹⁴⁷ の変異体は、MCH の pEC₅₀ 値には影響を与えることなく、MQ1 の IC₅₀ 値を有意に低下させた(表 2-5)。これらの結果は Ala¹³⁶ 及び His¹⁴⁷ が MQ1 への結合に関与することを示すものであり、MQ1 が MCH とは異なるサイトに結合することを裏付けるものである。

2-2-9) MQ1 の選択性

MQ1 の他のタンパク質に対する選択性を調べるために、GPCR、酵素、イオンチャネル等を含む約 100 種類の創薬標的分子に対する影響を、Ricerca Biosciences 社(Concord, OH)において結合試験または酵素試験で評価した。この結果、MQ1 は 1 μ M においていずれの分子に対しても活性を示さなかった(data not shown)。特に、MCHR1 と相同性の高い MCHR2、ソマトスタチン受容体 1、 μ -オピオイド受容体等に対しても、活性を示さなかったことから、MQ1 は MCHR1 に極めて選択性の高い化合物であることが示された。

表 2-5 MCHR1 への変異導入が MCH 及び MQ1 の活性に与える影響

| 受容体 | MCH pEC ₅₀ | MQ1 pIC ₅₀ |
|-----------|-----------------------|-----------------------|
| wild type | 8.7 ± 0.20 | 8.7 ± 0.20 |
| TMヘリックス3 | | |
| A136V | 8.5 ± 0.50 | 10 ± 0.46* |
| A138V | 8.9 ± 1.1 | 9.4 ± 2.0 |
| H147A | 7.9 ± 0.34 | 10 ± 0.38* |
| TMヘリックス5 | | |
| W207A | 8.9 ± 0.61 | 7.6 ± 0.54 |
| F208A | 8.2 ± 0.51 | 8.7 ± 0.37 |
| T209A | 7.7 ± 0.29* | 9.1 ± 0.47 |
| L210A | 8.6 ± 0.31 | 9.8 ± 0.50 |
| F214A | 8.7 ± 0.33 | 9.0 ± 0.31 |
| A216V | 8.1 ± 0.40 | 8.9 ± 1.2 |
| V223A | 8.7 ± 1.1 | 8.4 ± 0.39 |
| A227V | 8.2 ± 0.17 | 8.4 ± 0.18 |
| V229A | 8.3 ± 0.13 | 8.4 ± 0.18 |
| TMヘリックス6 | | |
| I259A | 8.2 ± 0.24 | 8.6 ± 0.32 |
| L263A | 8.2 ± 0.30 | 8.8 ± 0.29 |
| W269A | 8.7 ± 1.3 | 9.4 ± 0.85 |
| L275A | 8.3 ± 0.33 | 8.4 ± 0.79 |
| Q276A | 7.0 ± 0.15* | 8.9 ± 0.25 |
| T278A | 8.5 ± 0.16 | 8.7 ± 0.20 |

MCHR1 への変異導入が MCH や MQ1 の阻害活性に及ぼす影響をβ-アレスチンシグナル測定系で調べ、MCH 及び MQ1 の pEC₅₀ と pIC₅₀ をそれぞれ示した。mean ± SEM (quadruplicate)。*: $p < 0.05$ (野生型との比較、統計解析は unpaired *t*-test)

2-3 まとめと考察

第2章では武田薬品工業株式会社で創出された MCHR1 拮抗薬 MQ1 の作用機序を分子レベルで明らかにすることを目的とし、種々の生化学的及び分子細胞学的解析を実施した。MCHR1 のシグナル経路に与える影響を調べた結果、MQ1 は MCHR1 の複数のシグナル経路を一律に抑制する拮抗薬であることが明らかになった。更に MQ1 は受容体からの解離が遅い可逆的な化合物であること、そして MCHR1 のネガティブアロステリックモジュレーターとして作用することが明らかとなった。MQ1 による MCHR1 の阻害の模式図を図 2-14 に示し、複数シグナル経路阻害、受容体からの遅い解離、ネガティブアロステリックモジュレーションについて以下に考察する。

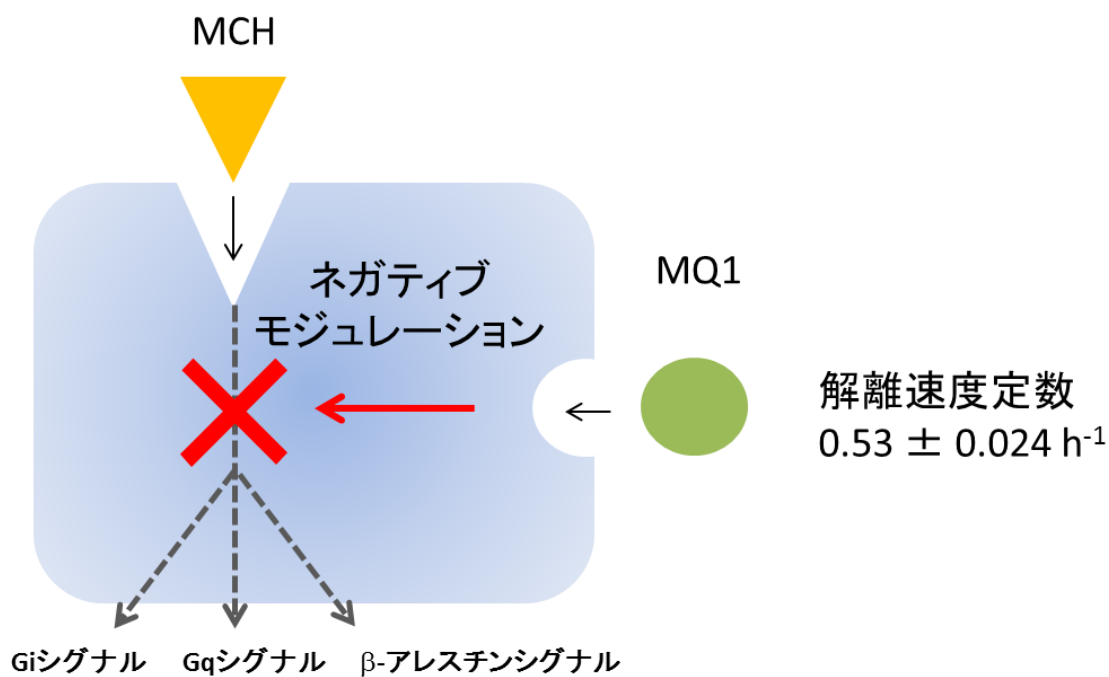


図 2-14 MQ1 による MCHR1 のアロステリック阻害の模式図

複数のシグナル経路の阻害

MQ1 は $G\alpha_i$ と β -アレスチンのシグナルをそれぞれ $5.7 \pm 1.7 \text{ nM}$ と $1.7 \pm 0.14 \text{ nM}$ の IC_{50} 値で阻害した。これは、 $[^{125}I]MCH-(4-19)$ を用いた結合試験における IC_{50} 値($2.2 \pm 0.036 \text{ nM}$)と同程度の活性である。一方で、細胞内カルシウムフラックスアッセイで測定した際の IC_{50} 値は $30.6 \pm 6.7 \text{ nM}$ と若干弱く算出された。この原因は、細胞内カルシウムフラックスアッセイが非平衡状態で実施されたためだと考え、MQ1 と MCHR1 安定発現細胞を 60 分反応させた後、MQ1 の活性評価を行った。その結果 MQ1 の活性は $5.2 \pm 2.9 \text{ nM}$ と、他の試験と同程度まで上昇した。以上の結果より、MQ1 は平衡状態で評価した場合、複数のシグナルを同程度の強さで阻害する働きを持つことが示された。

これまでに $G\alpha_q$ や $G\alpha_i$ のシグナルを阻害する幾つかの MCHR1 拮抗薬が報告されているが(90-92)、 β -アレスチンシグナル阻害作用に関する報告は無い。 β -アレスチンシグナルは、インターナリゼーションやそれに続く脱感作に関わる他にも、様々なシグナル伝達系に関与することが近年明らかになってきた(30)。MCHR1 の場合は、薬効発揮に関与するシグナル経路が現在のところ不明であり、また *in vivo* で実際に流れるシグナル経路に関する情報も無い。こうした点を考慮すると、リコンビナント過剰発現系で検出される全てのシグナル経路を遮断することは、*in vivo* で薬効を確実に発揮するために重要だと考えられる。従って、全てのシグナル経路を遮断する MQ1 の性質は *in vivo* での薬効発揮の可能性を高めるものであり、拮抗薬として好ましいプロファイルだと考えられる。また近年は、各シグナル経路ごとに異なる作用を有するバイアスアゴニストと呼ばれる化合物の報告が相次いでおり(47,93-95)、薬剤の最適化研究を行うにあたって、各シグナル経路とその生理的役割との関係性理解の重要性が高まっている。こうした観点からも、本章で実施した各種シグナル経路の測定系構築及び化合物の阻害活性の把握は、MCHR1 拮抗薬の研究推進にあたって重要な意義を持つと考えられる。

受容体からの遅い解離

細胞ベースの β -アレスチンシグナルアッセイ(図 2-4A)、そして細胞フリーの $[^{125}I]MCH-(4-19)$ 結合試験(図 2-4B)いずれにおいても、MQ1 の阻害活性は時間経過と共に増強した。更に MQ1 の阻害活性はウォッシュアウト後も減弱しなかった(図 2-7A)。これらの結果は MQ1 が MCHR1 からゆっくりと解離する化合物であることを示唆するものである。一般的に解離の遅い拮抗薬は、受容体への滞留時間が伸びることで薬効の持続が期待される(88,96,97)。例えば、アンジオテンシン AT1 受容体拮抗薬である *candesartan* は解離の遅い薬剤であることが知られているが、この化合物は解離の速い他の薬剤に比べて強力な降圧作用を有することが報告されている(98,99)。また、 μ -オピオイド受容体拮抗薬 *buprenorphine* の薬理作用は受容体からの解離の遅さに起因していることが示されている(100)。従って、最適化研究においては、化合物の解離速度に関する速度論的解析を行うことが、正確な構造活性相関を得るために重要である。そこで化合物の解離速度定数を直接

的に求めるために、ASMS を用いた結合試験系を構築した。この試験により、MQ1 の解離速度定数は $0.53 \pm 0.024 \text{ h}^{-1}$ と算出された。一方で、異なる反応時間で実施した $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ 結合試験の結果から時間依存性が低いと考えられた MQ2 は、ウォッシュアウトにより阻害活性が大幅に減弱した(図 2-7B)。さらに ASMS を用いた結合試験系で算出された解離速度定数は $2.6 \pm 0.2 \text{ h}^{-1}$ であり、MQ1 よりも約 5 倍速いことが示された。このように、僅かな化学構造の変化が解離速度を大きく変えることは特筆に価するとともに、最適化研究における速度論的解析の重要性を示すものだと考えられる。これまでに多くの MCHR1 拮抗薬が報告されているが、詳細な速度論的解析が実施された例はなく、MQ1 は解離速度が遅いことが示された初めての MCHR1 拮抗薬である。MQ1 のこのユニークな性質は *in vivo* における薬効持続に貢献するものと期待される。

ネガティブアロステリックモジュレーション

MQ1 の阻害様式を調べた結果、MQ1 は insurmountable な阻害作用を示した(図 2-10, 2-11)。一般的に、insurmountable な阻害作用を引き起こす原因としては、非平衡状態での評価、不可逆的阻害、化合物による細胞傷害性そしてネガティブアロステリックモジュレーション等が考えられる (101)。そこでまず、試験が非平衡状態で行われている可能性を排除するために、MQ1 と MCH の反応時間を 8 時間に設定した。これは 4 時間と 8 時間の反応時間を比較した際に、MQ1 の阻害活性や MCH の E_{max} の抑制率に変化が無かったことから(表 2-2、図 2-9)、本試験系は 4 時間で平衡に達していると判断したためである。従って、MQ1 による insurmountable な阻害作用は非平衡状態での評価に起因するものではないと考えた。続いて、MQ1 が不可逆的な拮抗薬である可能性を、ASMS を用いた結合試験を使って検証した。その結果、MQ1 の MCHR1 膜画分に対する特異的な結合が確認され、MQ1 の MCHR1 に対する結合は可逆的であることが示された(図 2-6)。また、MQ1 添加は、細胞の生存率に影響を与えないことから、MQ1 は細胞傷害性を有していないことが示された。

以上の結果より、MQ1 はネガティブアロステリックモジュレーターとして作用する可能性が示された。そこで MQ1 が MCHR1 のアロステリックサイトに結合することを確かめるために、放射性ラベルした $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ を用いた速度論的解析を実施した。化合物の結合速度定数及び解離速度定数は、相互作用する受容体の立体構造によって規定される固有の値である。従ってアロステリックモジュレーターの結合によって受容体の立体構造が変化すると、オルソステリックリガンドの結合速度定数または解離速度定数、或いはそのいずれもが変化することが予想される (35)。MCH-(4-19) のペプチドアナログである MCH-(1-19) は $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ の解離速度定数を変化させなかったのに対して、MQ1 は顕著な変化を引き起こし(図 2-12)、MQ1 がアロステリックサイトに作用することを裏付ける結果となった。興味深いことに $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ の解離速度定数は MQ1 によって低下することが明らかになった。これまでも幾つかのネガティブアロステリックモジュレーター

で同様の傾向が確認されている。例えばムスカリン性アセチルコリン受容体のネガティブアロステリックモジュレーターはオルソステリック作動薬の結合親和性を弱める一方で、解離速度定数を低下させる作用があることが報告されている(102)。従って、MQ1 はこうした化合物同様に、受容体の立体構造を変化させた結果、結合速度定数及び解離速度定数のいずれをも低下させる性質を有していると考えられる。

また、MQ1 の結合部位が MCH のそれと異なることを別の手法で示すために、 β -アレシチンシグナル測定系を利用した変異体実験を行った。ネガティブアロステリックモジュレーターとの複合体として GPCR で唯一結晶構造情報がある CRF1R の情報(41)をもとに、CRF1R のアロステリックサイトに相当する部位に変異導入を行った。ほとんどの変異体で MCH の EC₅₀ 値に変化は無かったことから、これらの変異は MCHR1 の立体構造や MCH との結合に影響を与えないことが示唆された。一方で、3 番目の TM ヘリックスに存在する Ala¹³⁶ と His¹⁴⁷ を置換すると、MCH の EC₅₀ 値には影響を与えずに MQ1 の阻害活性のみを有意に変化させたことから(表 2-5)、これらのアミノ酸が MQ1 との結合に関与することが示唆された。これらの結果は、MQ1 が生体内リガンドである MCH とは異なる部位、すなわちアロステリックサイトに作用することを裏付けるものである。CRF1R の結晶構造情報によれば、CRF1R のネガティブアロステリックモジュレーターである CP-376395 は、TM ヘリックスの細胞質側奥深くに結合しており、リガンドの CRF が先に結合した場合、CP-376395 はアロステリックサイトにアクセス出来ないことが予想される(41)。一方で、MQ1 は MCHR1 に結合している MCH の解離速度定数を変化させた。これは、MCH が MCHR1 に結合している状態であっても、MQ1 が MCHR1 のアロステリックサイトにアクセス出来ることを示唆しており、こうした結果は MQ1 の結合様式が CP-376395 の CRF1R に対するそれとは異なることを示すものであると考えられる。

最後に、MQ1 は MCHR1 と相同性の高い GPCR を含めた多くのタンパク質に対して活性を示さず、MCHR1 に対して極めて高度な選択性を有していることを確認した。一般的にアロステリックサイトはオルソステリックサイトと比較して構造的多様性が豊かだと考えられており、この結果アロステリックモジュレーターは高度な選択性の獲得が期待される(35)。従って MQ1 の極めて高い選択性は、アロステリックサイトへの結合に起因していることが、一つの可能性として考えられる。

これまでに MCHR1 拮抗薬としては、競合的拮抗薬(91)、オルソステリックサイトに結合する insurmountable な拮抗薬(92)、そして非競合的拮抗薬(103)が報告されている。しかしながら、これまでにアロステリックサイトに結合することが明確に示された MCHR1 拮抗薬の報告は無い。本研究は、MCHR1 に低分子化合物が作用できるアロステリックサイトが存在することを示した初めての報告である。更に低分子化合物がこのアロステリックサイトに結合することで、複数のシグナル経路の抑制、受容体からの遅い解離、高度な選択性など、拮抗薬として好ましいプロファイルを獲得できることが明らかになった。これらの知見は MCHR1 拮抗薬の研究開発活動を促進させると共に、MQ1 が既存の化合物と比較

した際に、拮抗薬として優れたプロファイルを有していることを示すものである。

2-4 実験方法

1) 実験材料

MCH

(Asp-Phe-Asp-Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val, disulfide bond between Cys⁷-Cys¹⁶), leupeptin 及び phosphoramidon はペプチド研究所から購入した。MCH-(4-19) (Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val, disulfide bond between Cys⁴-Cys¹³) 及びペプチド性 MCHR1 拮抗薬 [Gva (5-guanidinovaleric acid)-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Ava (aminovaleric acid)-Cys-NH₂, disulfide bond between Cys²-Cys¹⁰] (104)は東レリサーチセンター及びベックスからそれぞれ購入した。Opti-MEM、Lipofectamine LTX 及び L-glutamine は Life Technologies から購入した。3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonic acid (CHAPS)及び Tween20 は、シグマアルドリッチ及びバイオラッドからそれぞれ購入した。これら以外の実験材料は和光純薬から購入した。また、MQ1 4-(cyclopropylmethoxy)-*N*-(8-methyl-3-((1*R*)-1-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)quinolin-7-yl)-benzamide (86)、MQ2 4-(4-hydroxybutoxy)-*N*-(8-methyl-3-((1*R*)-1-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)quinolin-7-yl)benzamide 及び MQ3 4-(cyclopropylmethoxy)-*N*-(8-methyl-3-(((1-oxidotetrahydro-2*H*-thiopyran-4-yl)amino)methyl)quinolin-7-yl)benzamide の構造を図 2-1 に示した。

2) 安定発現細胞の構築

①ヒト MCHR1 発現細胞の作成

ヒト MCHR1 をコードした cDNA 断片を pAKKO-111H プラスミド (62)に挿入し、発現ベクターを構築した。CHO dhfr⁻細胞を 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 及び 10% FBS 含有 MEM Alpha without DNA/RNA で培養し、上記発現ベクターをエレクトロポレーションで導入した。翌日、単クローンを得るために、細胞を 100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin 及び 10% dFBS 含有 MEM Alpha without DNA/RNA で 10,000 倍希釈し、96 穴プレートに播種した。細胞は 37°C に保温した 5% CO₂ 存在下のインキュベーターで 3 週間培養した。得られたヒト MCHR1 のクローンは、MCH 刺激で応答を確認した。

②ヒト MCHR1/β-アレスチン発現細胞の作成

β-アレスチンシグナル測定系構築にあたっては、ヒト MCHR1 をコードした cDNA 断片を、DiscoverX から購入した pCMV-ProLink プラスミドに挿入し、発現ベクター pCMV-PL/hMCHR1 を構築した。この発現ベクターを、同じく DiscoverX から購入したβ-

アレスチン- β -gal-EA 融合タンパク質安定発現 CHO-K1 細胞(CHO-K1-BAEA 細胞)に FuGENE 6 Transfection Reagent (プロメガ)を用いて導入した。翌日、単一クローンを得るために、細胞を 100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin、2 mM L-glutamine、500 μ g/ml G418 及び 10% FBS 含有 Ham's F-12 で 10,000 倍希釈し、上記 2) ①と同様の方法でクローンを取得した。

3) 細胞内 cAMP 濃度の測定

細胞内 cAMP 濃度は PerkinElmer から購入した AlphaScreen cAMP Assay kit を用いて、製品添付のプロトコルに従って測定した。具体的には、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin 及び 10% dFBS 含有 MEM Alpha without DNA/RNA で培養した MCHR1 安定発現 CHO dhfr-細胞を回収後、 1.0×10^6 cells/mL になるように AlphaScreen cAMP assay buffer (50 mM HEPES、500 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine 及び 0.1% BSA 含有 HBSS)で懸濁し、10 μ l を 384 穴オプチプレート(PerkinElmer)に添加した。続いて評価化合物及び 20 μ M のフォルスコリンを含む AlphaScreen cAMP assay buffer 10 μ l を添加し、室温で 8 時間反応した。その後、30 μ L の anti-cAMP acceptor beads 及び biotinylated-cAMP/streptavidin donor beads 懸濁溶液を添加し、2 時間反応した後、プレートリーダ Envision で蛍光強度(680 nm, 620 nm)を測定した。

4) 細胞内カルシウムフラックスの測定

100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin 及び 10% dFBS 含有 MEM Alpha without DNA/RNA で培養した MCHR1 安定発現 CHO dhfr-細胞を、黒色透明 384 穴プレート(BD Biosciences)に、 1.0×10^4 cells/30 μ l の密度になるように播種し、37°Cに保温した 5% CO₂ 存在下のインキュベーターで培養した。翌日、培地を除去し 30 μ l のローディングバッファー[0.1% BSA、0.3 μ g/mL fluo-4AM (同仁化学研究所)、2.5 mM probenecid (同仁化学研究所)及び 0.08% Cremophor EL (同仁化学研究所)含有 50 mM HEPES (pH 7.5)]を添加した。37°Cに保温した 5% CO₂ 存在下のインキュベーターで 30 分間反応した後、室温に戻し、HBSS assay buffer (50 mM HEPES 及び 0.1% BSA 含有 HBSS)で溶解した評価化合物を 10 μ l 添加した。室温で 10 分間反応した後、HBSS assay buffer で溶解した MCH を添加し、その時の細胞内カルシウムフラックスを FLIPR Tetra (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)で測定した。

5) β -アレスチンシグナルの測定

50 mM HEPES、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin、100 μ g/ml G418 及び 10% FBS 含有 Ham's F-12 で培養したヒト MCHR1/ β -アレスチン発現細胞を、白色 384 穴プレート(Corning)に、 5.0×10^3 cells/30 μ l の密度になるように播種し、37°Cに保温した 5% CO₂ 存在下のインキュベーターで培養した。翌日、培地を除去し、0.1% BSA 含有 Opti-MEM

で溶解した評価化合物及び MCH を 25 μ l 添加した。37°C に保温した 5% CO₂ 存在下のインキュベーターで 4 時間反応した後、12.5 μ l の PathHunter detection reagent (DiscoverX) を添加した。室温で 2 時間反応した後、プレートリーダー Envision で発光強度を測定した。

6) [¹²⁵I]MCH-(4-19)を用いた結合試験

ヒト MCHR1 膜画分とヨードラベル MCH ([¹²⁵I]MCH-(4-19))の調製及び受容体結合アッセイは Takekawa らの報告(90)に従って実施した。MCH-(4-19)は 50 mM ホウ酸バッファー(pH 8.0)中で [¹²⁵I] (monoiodinated) Bolton–Hunter reagent と 37 °C で 2 時間反応させた。反応液は TSK gel ODS-80TM column (4.6 × 250 mm, Tosoh)を用いて HPLC で分離した。アセトニトリル 20%から 60%までの濃度勾配溶出を行い、流速 1.0 ml/分で 35 分間かけて分離した。主要なヨード化ピークを回収し、MCHR1 binding buffer [1 mM EDTA、0.1% BSA、0.06% CHAPS、10 μ g/ml of phosphoramidon 及び 20 μ g/ml of leupeptine 含有 25 mM Tris-HCl (pH7.5)]で溶解した。得られたラベル体([¹²⁵I]MCH-(4-19))は、0.4 μ g のヒト MCHR1 膜画分と 200 μ l の MCHR1 binding buffer 中で、室温で 1 時間反応した。 [¹²⁵I]MCH-(4-19)の濃度は 50 pM とした。反応液は GF/C フィルタープレート (GE Healthcare Life Sciences)を用いて濾過し、フリーの [¹²⁵I]MCH-(4-19)を除去した。フィルタープレートを乾燥させた後、Microscint-0 (PerkinElmer)を 25 μ l/well で添加し、放射活性を TopCount liquid scintillation counter (PerkinElmer)を用いて測定した。0.3 μ M の非標識 MCH-(4-19)を添加した際の放射活性を非特異的結合とし、全結合量から非特異的結合を差し引いた値を特異的結合とした。

7) Affinity Selection Mass Spectrometry (ASMS)を用いた結合試験

54 μ g のヒト MCHR1 膜画分と MQ1 を、180 μ l の ASMS binding buffer [1 mM EDTA、10 μ g/ml of phosphoramidon、20 μ g/ml of leupeptine 及び 0.005% (v/v) Tween-20 含有 25 mM Tris-HCl (pH7.5)] 中で 3.5 時間室温で反応した。反応液はゲル (Sephadex G50-Superfine, GE healthcare)を充填させたフィルタープレート (MSHVN45, Millipore Corp, Billerica, MA)を用いて濾過し、フリーの MQ1 を除去した。25 μ l の溶出サンプルに、同量の 70%アセトニトリルを添加することで、化合物/受容体複合体を変性させた。受容体から解離した化合物は、electrospray ionization liquid chromatography mass spectrometry (ESI-LC/MS) [API5000 LC/MS/MS system (AB SCIEX)]を用いて定量した。移動相は溶媒 A として 0.2% ギ酸含有 10 mM ギ酸アンモニウム、溶媒 B として 0.2% ギ酸含有アセトニトリルを用いた。流速は 1.0ml/分とし、下記の濃度勾配で MQ1 を逆相カラム(Unison UK-C18, 30 × 2.0 mm, Imtakt)に吸着、溶出した。

[0-0.1 min: 10% solvent B, 0.1-0.25 min: 10%-98% solvent B, 0.25-0.5 min: 98% solvent B]

カラムオープンの温度は 50°C に設定した。MQ1 及び MQ2 のマストランジション(Q1/Q3)

はそれぞれ 430.3/359.2 及び 448.3/377.2 であった。30 μM の MQ2 を添加した際の結合量を非特異的結合とし、全結合量から非特異的結合を差し引いた値を特異的結合とした。

8) ASMS を用いた解離アッセイ

165 μg のヒト MCHR1 膜画分と MQ1 (10 nM) または MQ2 (60 nM) を、550 μl の ASMS binding buffer 中で、1 時間室温で反応した。過剰量(50 μM)の MQ3 を添加し、一定時間後に 25 μl の反応液を回収して、受容体に結合している化合物の量を上記 7) の方法で測定した。

9) 結合親和性(K_i 値)の算出

化合物の結合親和性(K_i)値は下記の式を使って求めた(35)。

$$\text{IC}_{50} = K_i ([A] + K_d) / (\alpha [A] + K_d)$$

IC_{50} 値は ^{125}I MCH-(4-19)を用いた結合試験系(8時間反応)で、50%の阻害を引き起こす化合物濃度である。また K_d 値は ^{125}I MCH-(4-19)の結合親和性を、 α はアロステリック化合物の cooperativity を示す(35)。 β -アレスチンシグナル試験の結果より、MQ1、MQ2 及びMQ3 の α はいずれも0.001以下であると算出された。

10) 変異体を用いた作用部位解析

部位特異的な変異は、QuickChange II XL mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) を使用して、製品添付のプロトコルに従って導入した。発現ベクターpCMV-PL/hMCHR1 を鋳型とした。18 箇所のアミノ酸を選択し、アラニンはバリンに、またそれ以外のアミノ酸はアラニンに変換した。変異体の配列は Genetic Analyzer (Life Technologies)によって確認した。変異体ベクターは FuGENE 6 Transfection Reagent を用いて CHO-K1-BAEA 細胞に導入した。翌日細胞を白色 384 穴プレート(Corning)に播種し、上記 5) の方法で化合物の活性を評価した。

11) データ解析

データ解析は GraphPad Prism5 software を用いて行った。 EC_{50} 値、 IC_{50} 値及び K_d 値はデータを sigmoidal dose-response の式にフィッティングすることで算出した。解離アッセイにおける K_{off} 値は、データを $Y=Ae^{-kx}$ の式にフィッティングすることで算出した。P 値 <0.05 を統計学的に有意であると判定した。

第三章

MT₂メラトニン受容体選択的部分作動薬の薬理的解析

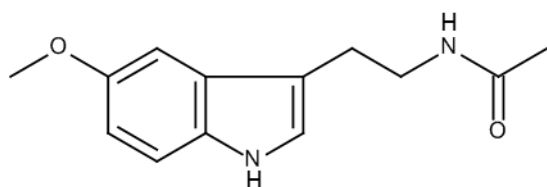
3-1 緒言

メラトニン(図 3-1A)はヒト及び哺乳類において松果体から分泌される神経ホルモンである(105,106)。メラトニンの分泌量は一日ごとのサイクルで変化し、睡眠周期や体温の調節等を行うことで、生物学的機能のサーカディアンリズム(概日リズム)に関与する(107,108)。そのためメラトニンはヒトにおいて、時差ボケ(109,110)、交代勤務睡眠障害(111)、睡眠相後退症候群(112,113)等の概日リズム性睡眠障害の治療に有効だと考えられている。これらのメラトニンの機能は、主に MT₁メラトニン受容体(MT₁受容体) (114) と MT₂メラトニン受容体(MT₂受容体) (115)と呼ばれる二種類の GPCR によって仲介されると一般的に考えられている。MT₁受容体は視交叉上核を中心に脳での発現が高い一方、MT₂受容体は主に視交叉上核と網膜で発現している。これら二つのメラトニン受容体サブタイプはアミノ酸レベルで 60%の相同性を有し、いずれも G α_i タンパク質と共役することが知られているが(114-116)、その生理的な役割は異なるとされる。MT₁受容体の欠損は、メラトニンによる神経発火抑制作用や睡眠誘発作用を阻害するが、メラトニンによって引き起こされる概日リズムの位相変化には影響を与えない(117)。この事実は、概日リズムの位相変化への MT₂受容体の関与を示唆するものであり、実際に MT₂受容体選択的拮抗薬をマウスに投与すると、メラトニンによる位相前進が抑制されることも確かめられている(118)。これらの結果は MT₂受容体が、概日リズムの同調作用に関与するとともに(119)、不眠症や概日リズム性睡眠障害等の睡眠障害治療薬の創薬標的としての可能性を示唆するものである。こうした知見から、MT₁/MT₂受容体を活性化させる薬剤は、睡眠障害治療に有効だと考えられる。一方で、生理的リガンドであるメラトニンの経口投与時の睡眠導入作用は報告によりばらつきがあり、必ずしも効果が高くないため、現在は栄養補助食品サプリメントとしての使用に限定されている(120-122)。

上記の背景を受け、武田薬品工業株式会社では、メラトニンよりも強力な活性を有する MT₁/MT₂受容体作動薬の開発を目指した探索研究を実施し、その過程で MT₂受容体を選択的な作動薬 IF1 (図 3-2)を創出した(123)。また、現在までに複数のグループからテトラリン系、ナフタレン系、インダニルピペラジン系(図 3-3)などの異なる MT₂受容体選択的作動薬が報告されているが(124-127)、これらの化合物の詳細な薬理的解析は実施されておらず、MT₂受容体の活性化機構は不明な点が多い。

第三章では、新規睡眠障害治療薬の創出を目指して、武田薬品工業株式会社で見出されたリード化合物 IF1 の MT₂受容体の活性化機構の分子レベルでの解析を実施した。本章では、IF1 の MT₂受容体に対する結合プロファイル及び部分作動活性について述べる。また β -アレスチンシグナルや G タンパク質シグナルなど各種経路の活性化と、MT₂受容体のインターナリゼーション誘導作用の関連性について述べる。

A



B

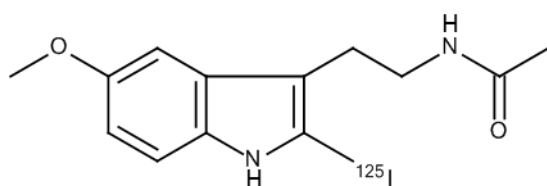
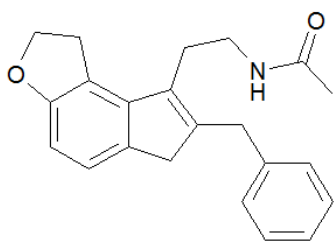
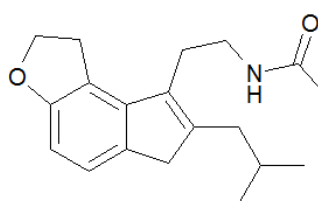


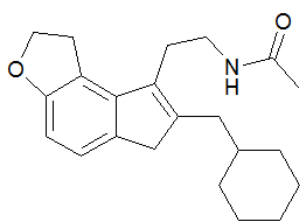
図 3-1 メラトニン(A)及び 2-[¹²⁵I]iodomelatonin (B)の化学構造式



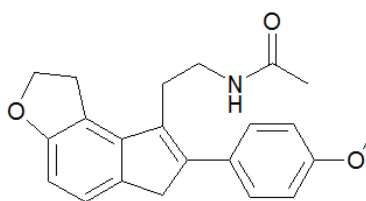
IF1



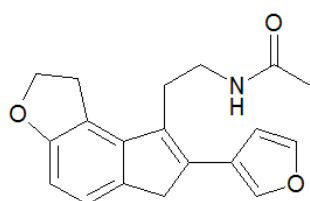
IF2



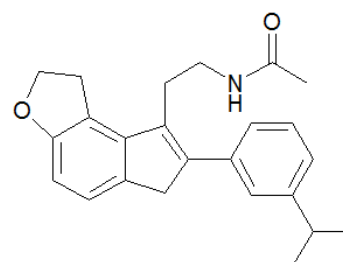
IF3



IF4

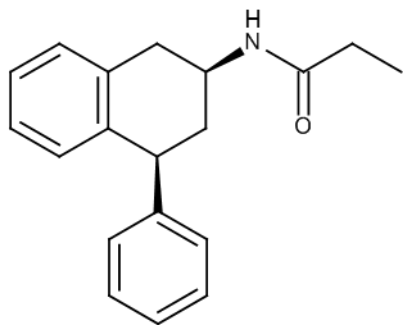


IF5

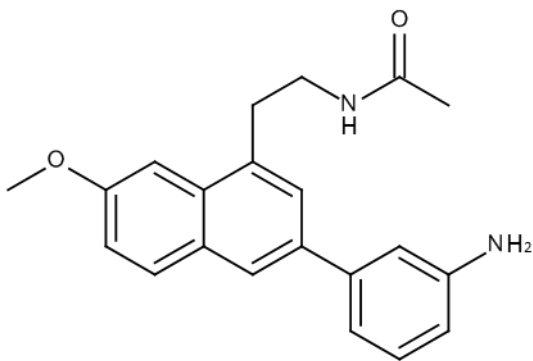


IF6

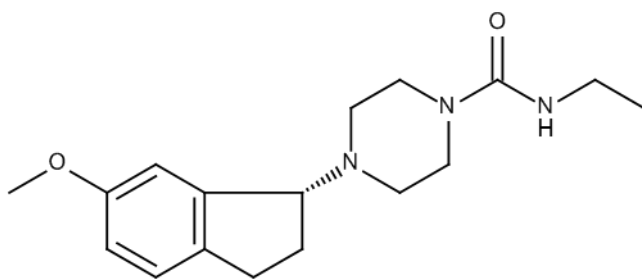
図 3-2 MT₂ 受容体作動薬の化学構造式



テトラリン系



ナフタレン系



インダニルピペラジン系

図 3-3 MT_2 受容体選択的作動薬の化学構造式

3-2 結果

3-2-1) IF1 の結合プロファイル

武田薬品工業株式会社は MT_1/MT_2 受容体作動薬の探索研究を実施する過程で、 MT_2 受容体を選択的な作動薬 IF1 (図 3-2) を創出した(123)。そこでこの化合物の結合プロファイルを詳細に調べるために、2-[125 I]iodomelatonin (図 3-1B) を用いた結合試験を実施した。まず本化合物の活性の時間依存性の有無を調べるために、異なる反応時間で評価を行った。その結果、IF1 とメラトニンのいずれも、0.5 時間と 2.5 時間の反応時間でヒト MT_2 受容体に対する活性に有意な差は認められなかった(図 3-4)。これらの結果は、IF1 とメラトニンのいずれもヒト MT_2 受容体に対して可逆的に、そして迅速に結合することを示している。続いて、これらの化合物の種差及び MT_1 受容体に対する選択性を調べ、その結果を表 3-1 に示した。IF1 はヒト、マウス、ラットいずれの種の MT_2 受容体に対しても高い結合親和性を有しており、その値は MT_1 受容体に対して、それぞれ約 370 倍、24 倍、360 倍程度強いことが明らかとなった。以上から、IF1 は MT_2 受容体を選択的な化合物であることが示された。

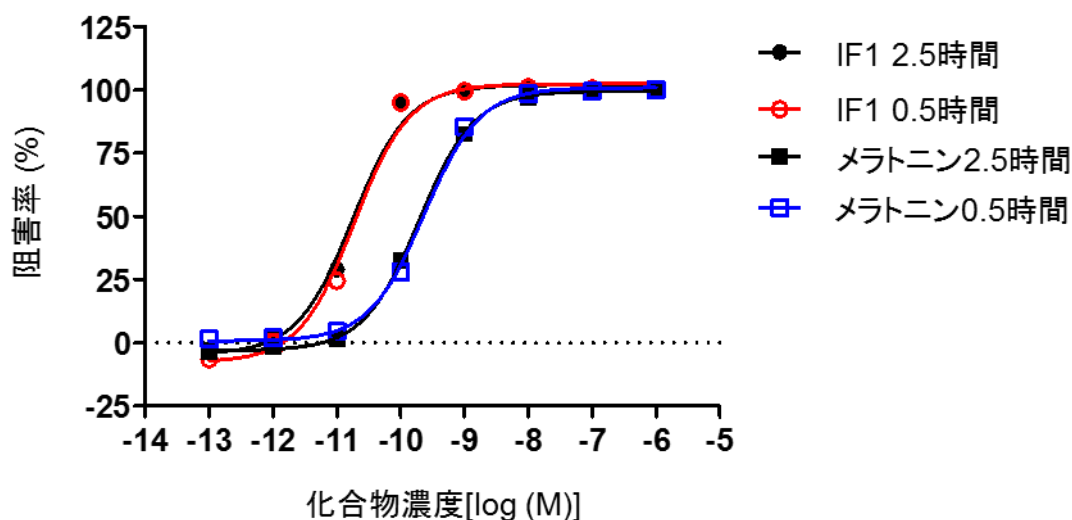


図 3-4 IF1 の時間非依存的な阻害活性

IF1 の濃度依存的な阻害活性を 2-[125 I]iodomelatonin を用いた結合試験で評価した。ヒト MT_2 受容体膜画分、2-[125 I]iodomelatonin 及び評価化合物を 0.5 時間または 2.5 時間反応させた。means \pm SEM (duplicate)。

表 3-1 メラトニン及び IF1 のメラトニン受容体に対する結合親和性

| 作動薬 | MT ₁ | | | MT ₂ | | |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|------------------|-------------------|
| | ヒト (nM) | マウス (nM) | ラット (nM) | ヒト (nM) | マウス (nM) | ラット (nM) |
| メラトニン | 0.22 ± 0.023 | 0.30 ± 0.026 | 0.16 ± 0.012 | 0.097 ± 0.0030 | 0.29 ± 0.048 | 0.25 ± 0.036 |
| IF1 | 3.3 ± 0.12 | 1.7 ± 0.40 | 18 ± 4.7 | 0.0089 ± 0.0013 | 0.072 ± 0.010 | 0.050 ± 0.0046 |

2-[¹²⁵I]iodomelatonin を用いた結合試験によって算出した IC₅₀ 値を使い、結合親和性を計算で導出した。means ± SEM (duplicate)。

3-2-2) MT₂受容体に対する IF1 の作動活性

IF1 の MT₂ 受容体に対する作動活性をより詳しく調べるために、ヒト MT₂ 受容体安定発現細胞を用い、MT₂ 受容体によって活性化される G α_i タンパク質の作用、すなわち細胞内 cAMP 量の抑制活性を検出する評価系(細胞内 cAMP 濃度測定系)を構築した。Koike らの報告(123)の通り、メラトニンは細胞内 cAMP 量の抑制活性を示し(図 3-5A)、IF1 はメラトニンに対して部分作動活性を示した(図 3-5B)。薬物の活性化の強さの指標である内活性は、生理的リガンドの最大活性を 100 とした際の薬物の相対的な最大活性で表され、IF1 の内活性は $71 \pm 1.1\%$ であった(図 3-5B、表 3-2)。この活性は G α_i タンパク質阻害剤である百日咳毒素(pertussis toxin; PTX)処理によって完全に抑制されたことから(図 3-5B)、IF1 の作動活性は PTX 感受性の G α_i シグナル経路を介していることが示唆された。

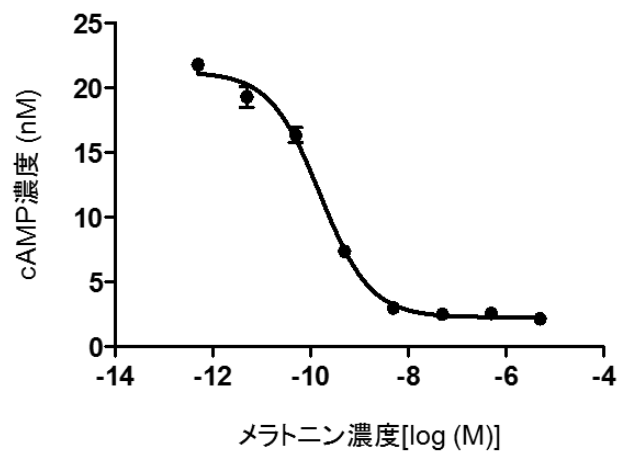
続いて、本化合物が ERK1/2 シグナル経路の活性化に及ぼす影響を調べるために、ERK1/2 のリン酸化の測定系を構築した。ERK1/2 シグナル経路は G α_i シグナル経路を含む様々なシグナル経路の下流に位置すると考えられている(128)。血清飢餓状態のヒト MT₂ 受容体安定発現細胞をメラトニンまたは IF1 で 5 分間反応し、ERK1/2 のリン酸化を検出した。メラトニンと IF1 のいずれも濃度依存的なリン酸化を惹起し、その EC₅₀ 値はそれぞれ 1.6 ± 0.18 nM 及び 2.2 ± 0.54 nM であった。一方で、IF1 の内活性はメラトニンの $14 \pm 0.50\%$ に留まり(図 3-5C、表 3-2)、ERK1/2 シグナル経路においても IF1 は部分作動薬として挙動することが明らかとなった。この作動活性も PTX 処理によって完全に抑制されることから(図 3-5C)、MT₂ 受容体による ERK1/2 のリン酸化は PTX 感受性の G α_i シグナル経路の下流に位置することが予想される。

一般的に活性化された GPCR は、G タンパク質シグナルに加えて、G タンパク質非依存的な β -アレスチンを介したシグナル経路も活性化し、そのシグナル経路はインターナリゼーションやそれに伴う脱感作に関与すると考えられている(27-29)。そこで IF1 の β -アレスチンシグナル経路に与える影響を調べるために、PathHunter β -arrestin assay を用いて β -アレスチンシグナル測定系を構築した。この測定系において、メラトニンは 0.33 ± 0.12 nM の EC₅₀ 値で作動活性を示した。一方で IF1 は 0.13 ± 0.082 nM の EC₅₀ 値で作動活性を示し、その内活性はメラトニンに対して $39 \pm 2.4\%$ であった(図 3-5D、表 3-2)。

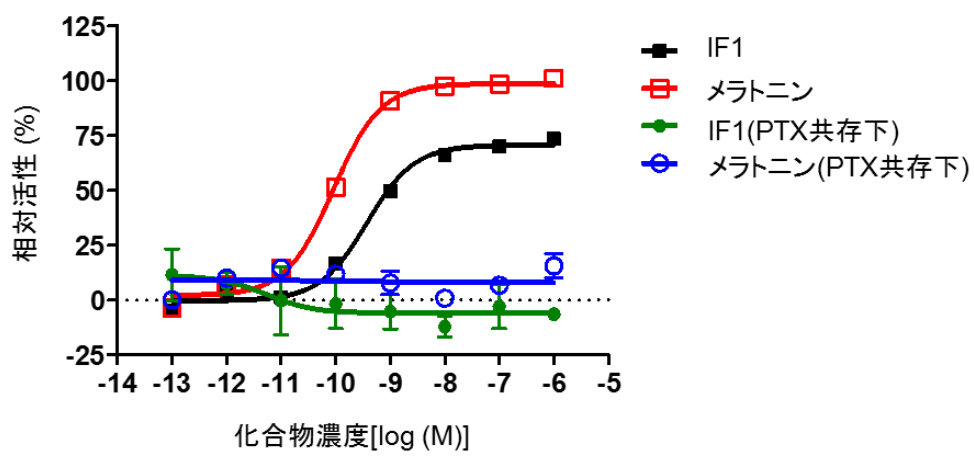
3-2-3) IF1 による MT₂ 受容体のインターナリゼーション

インターナリゼーションに関与するとされる β -アレスチンシグナル経路における IF1 の内活性は、メラトニンのそれよりも小さかった。従って、IF1 によって引き起こされる MT₂ 受容体のインターナリゼーションはメラトニンよりも小さいことが予測された。そこで、化合物が細胞膜上のヒト MT₂ 受容体量に与える影響を 2-[¹²⁵I]iodomelatonin を用いた細胞ベースの結合試験によって調べた。ヒト MT₂ 受容体安定発現細胞を 45 nM のメラトニンまたは 13 nM の IF1 と 3 時間反応した。化合物濃度は、 β -アレスチンシグナル測定系におけるそれぞれの EC₅₀ 値の 100 倍に設定した。細胞を洗浄後、2-[¹²⁵I]iodomelatonin の細胞膜

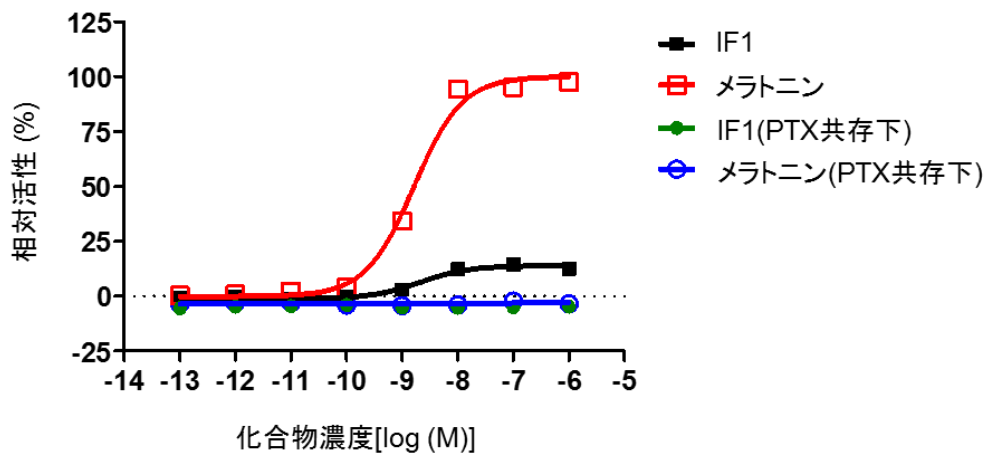
A



B



C



D

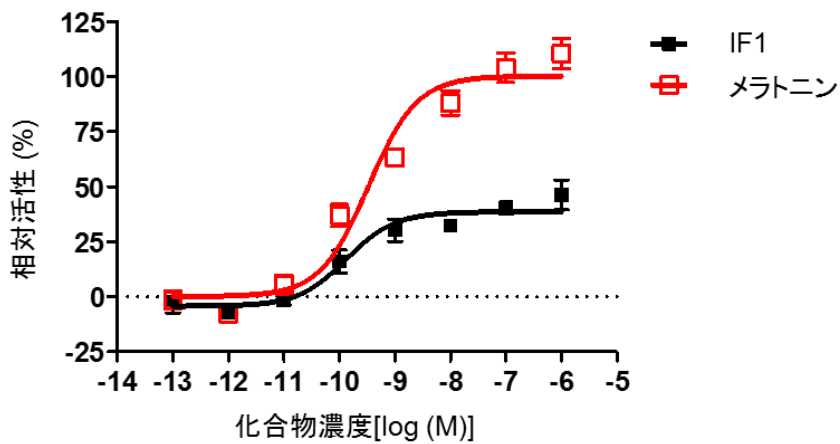


図 3-5 各種評価系におけるメラトニン及び IF1 の濃度依存的な活性

(A)メラトニンの MT_2 受容体に対する濃度依存的な効果を、細胞内 cAMP 濃度測定系を用いて測定した。(B) PTX 存在下または非存在下におけるメラトニン及び IF1 の濃度依存的な活性を細胞内 cAMP 濃度測定系で評価した。メラトニンの最大活性を 100%、メラトニン非添加時のベースの活性を 0%として相対活性を算出した。(C) PTX 存在下または非存在下におけるメラトニン及び IF1 の濃度依存的な活性を ERK1/2 リン酸化測定系で評価した。メラトニンの最大活性を 100%、メラトニン非添加時のベースの活性を 0%として相対活性を算出した。(D) メラトニン及び IF1 の濃度依存的な活性を β -アレスチンシグナル測定系で評価した。メラトニンの最大活性を 100%、メラトニン非添加時のベースの活性を 0%として相対活性を算出した。means \pm SEM (quadruplicate)。

表 3-2 各種評価系におけるメラトニン及びIF1のEC₅₀値と内活性

| 評価系 | メラトニン | | IF1 | |
|---------|--------------------------|--------|--------------------------|-----------|
| | EC ₅₀ (nM) | 内活性(%) | EC ₅₀ (nM) | 内活性(%) |
| cAMP | 0.091 ± 0.00090 | 100 | 0.38 ± 0.048 | 71 ± 1.1 |
| ERK1/2 | 1.6 ± 0.18 | 100 | 2.2 ± 0.54 | 14 ± 0.50 |
| β-アレスチン | 0.33 ± 0.12 | 100 | 0.13 ± 0.082 | 39 ± 2.4 |

細胞内 cAMP 濃度測定系、ERK1/2 リン酸化測定系及びβ-アレスチンシグナル測定系を用いて、メラトニン及びIF1のEC₅₀値と内活性を測定した。means ± SEM (quadruplicate)。

に対する結合量を調べた。化合物未処理のコントロールに対し、メラトニンを処理することで、細胞膜上のヒト MT₂ 受容体の量は $67 \pm 2.7\%$ に減少した(図 3-6)。その一方で IF1 を処理すると、細胞膜上のヒト MT₂ 受容体の量は $7.6 \pm 0.59\%$ にまで減少し、予想に反してメラトニンよりも強力なインターナリゼーションを引き起こすことが明らかとなった(図 3-6)。

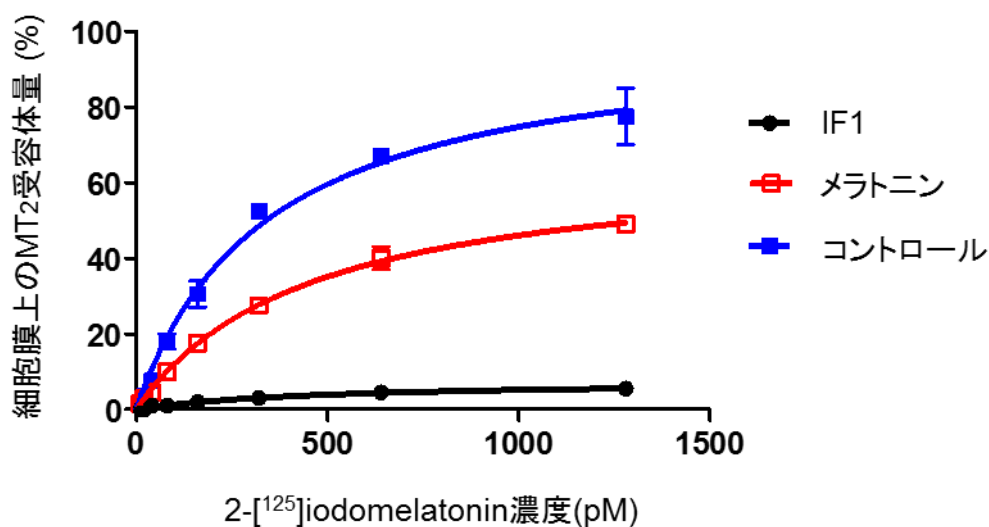


図 3-6 2-[¹²⁵I]iodomelatonin の細胞表面上 MT₂ 受容体への結合に IF1 が及ぼす影響
CHO-hMT₂ 細胞と IF1 (●) またはメラトニン(□) を 3 時間反応した後、2-[¹²⁵I]iodomelatonin の細胞表面上 MT₂ 受容体への結合量を測定した。薬剤非存在下(■)での 2-[¹²⁵I]iodomelatonin の B_{max} を 100% とし、各濃度における相対的な結合量をプロットした。mean ± SEM (triplicate)。

3-2-4) β -アレスチンシグナル経路と受容体インターナリゼーション強度の関係

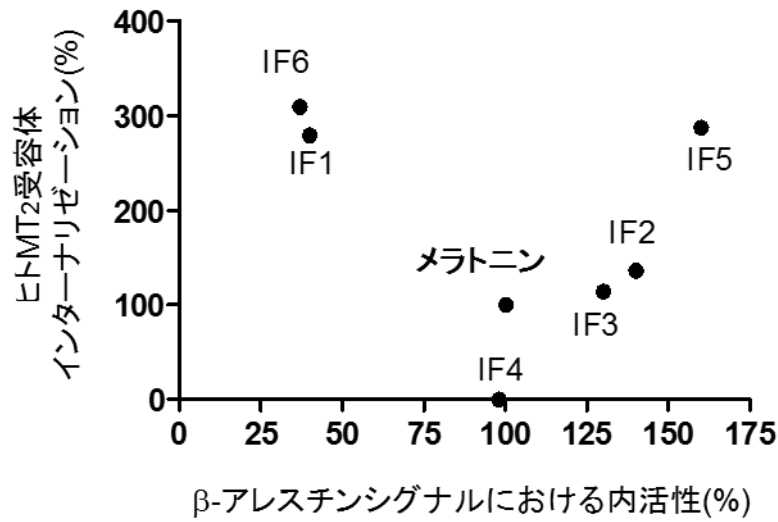
続いて β -アレスチンシグナル経路における化合物の内活性と受容体インターナリゼーション強度の関係について詳しく調べるために、内活性の異なる 5 種類の IF1 の構造類縁体 (IF2-6、図 3-2) を同様の方法で評価した。これらの化合物の β -アレスチンシグナル経路における内活性を表 3-3 にまとめた。図 3-7A に示す通り β -アレスチンシグナル経路における内活性とインターナリゼーション強度は互いに独立しており、相関関係は認められなかった ($R^2 = 0.094$)。例えば IF4 はメラトニンと同程度の内活性 ($98 \pm 4.7\%$) を有するが、メラトニンに対してわずか $0.19 \pm 13.5\%$ のインターナリゼーションしか引き起こさなかった。対照的に、IF6 の内活性は $37 \pm 3.5\%$ とメラトニンと比較して小さいが、メラトニンの 3 倍以上 ($309 \pm 1.6\%$) のインターナリゼーションを惹起した。続いて、 β -アレスチンシグナル経路における pEC_{50} とインターナリゼーション強度の関係について調べたが、両者の間にも相関関係は認められず互いに独立していることが示唆された (表 3-3、図 3-7B; $R^2 = 0.15$)。以上の結果より、ヒト MT_2 受容体のインターナリゼーションに対して、 β -アレスチンシグナル経路の活性化は関与しないことが示唆された。

表 3-3 MT_2 受容体作動薬の受容体インターナリゼーション強度と β -アレスチンシグナル測定系における活性値

| 作動薬 | インターナリゼーション (%) | 内活性 (%) | pEC_{50} |
|-------|-----------------|---------------|-----------------|
| メラトニン | 100 | 100 | 8.5 ± 0.13 |
| IF1 | 279 ± 4.9 | 40 ± 3.2 | 9.3 ± 0.27 |
| IF2 | 136 ± 10.0 | 140 ± 2.7 | 8.9 ± 0.066 |
| IF3 | 114 ± 10.4 | 130 ± 3.9 | 8.6 ± 0.11 |
| IF4 | 0.19 ± 13.5 | 98 ± 4.7 | 8.2 ± 0.16 |
| IF5 | 287 ± 1.6 | 160 ± 3.7 | 9.1 ± 0.080 |
| IF6 | 309 ± 1.6 | 37 ± 3.5 | 8.1 ± 0.27 |

各種 MT_2 受容体作動薬によって惹起される受容体インターナリゼーションの強度 (%) と β -アレスチンシグナル測定系における内活性と pEC_{50} を記載した。means \pm SEM (quadruplicate)。

A



B

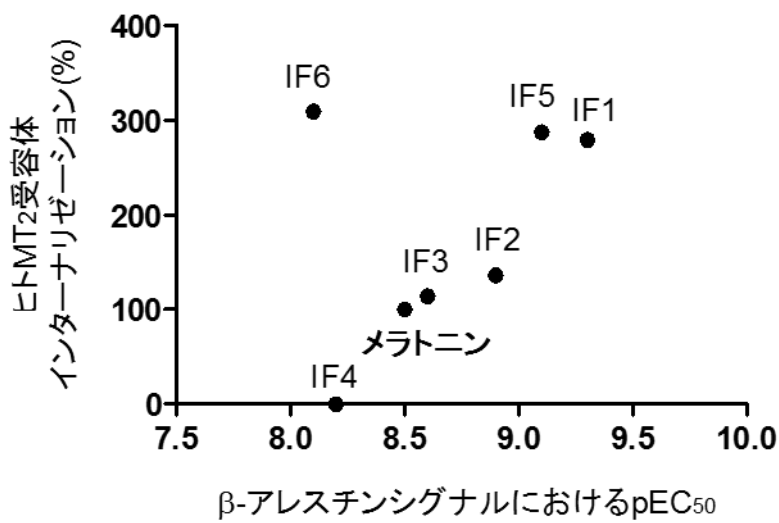


図 3-7 受容体インターナリゼーション強度とβ-アレスチンシグナル測定系における活性の比較
 各種 MT₂ 受容体作動薬によって惹起される受容体インターナリゼーション強度(%)とβ-アレスチンシグナル測定系における(A)内活性 または(B) pEC₅₀ をプロットした。

3-2-5) 他のシグナル経路のインターナリゼーションへの関与の検証

続いてヒト MT_2 受容体のインターナリゼーションへの $G\alpha_i$ シグナル経路または ERK1/2 シグナル経路の関与を調べるために、PTX 処理をしたヒト MT_2 受容体安定発現細胞に対する IF1 の影響を調べた。その結果、PTX 処理は IF1 によって引き起こされるインターナリゼーションに影響を及ぼさないことが明らかとなり(図 3-8)、 $G\alpha_i$ シグナル経路及び ERK1/2 シグナル経路のいずれもヒト MT_2 受容体のインターナリゼーションに関与しないことが示唆された。

さらに、 $G\alpha_i$ シグナル経路における IF1 から IF6 及びメラトニンの内活性や pEC_{50} とインターナリゼーションの強度の関係について調べたところ、やはりいずれのファクターとの間にも相関関係が認められず、 $G\alpha_i$ シグナル経路がインターナリゼーションへ関与しないことを裏付ける結果が得られた(図 3-9)。

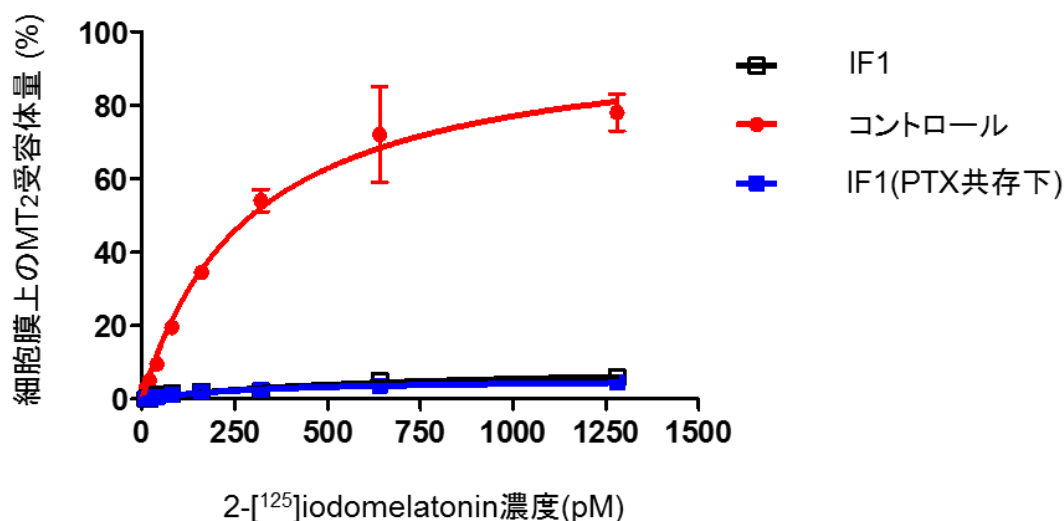


図 3-8 IF1 によって惹起される受容体インターナリゼーションに PTX が及ぼす影響
CHO-h MT_2 細胞と 100 ng/ml の PTX を 12 時間反応し、2-[¹²⁵I]iodomelatonin の細胞表面上 MT_2 受容体への結合に与える影響を調べた。mean \pm SEM (duplicate)。

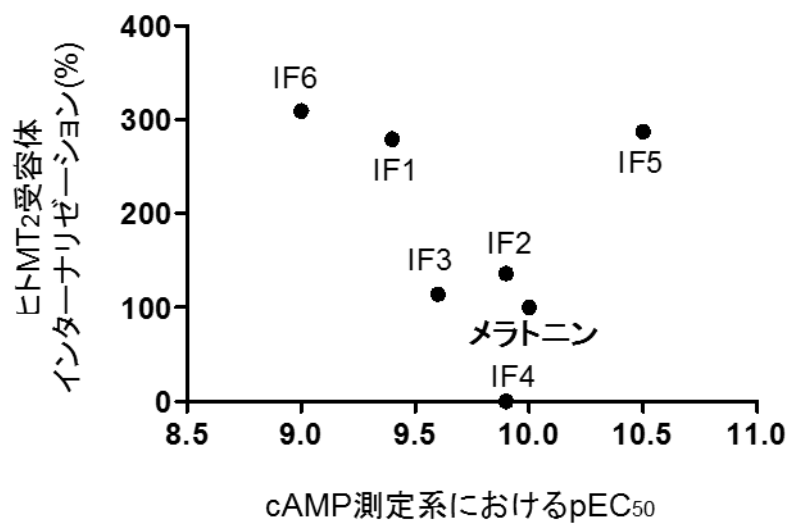
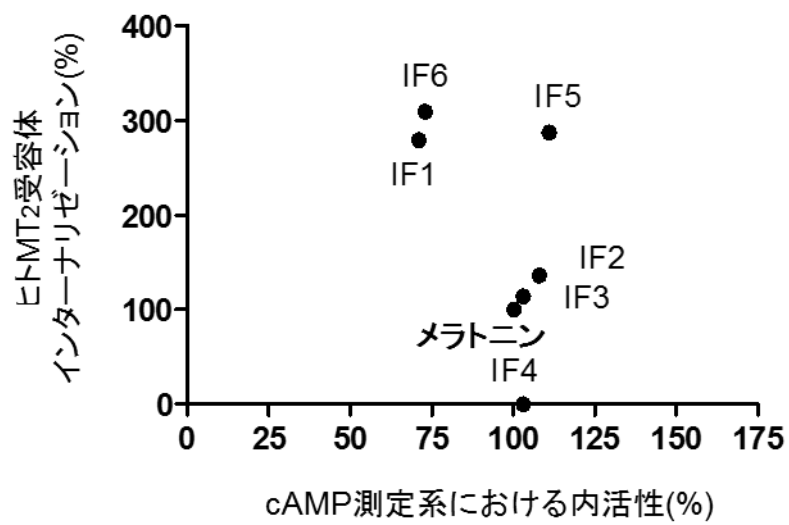


図 3-9 受容体インターナリゼーション強度と細胞内 cAMP 濃度測定系における活性の比較

各種 MT₂ 受容体作動薬によって惹起される受容体インターナリゼーション強度(%)と細胞内 cAMP 濃度測定系における(A)内活性 または(B) pEC₅₀ をプロットした。

3-3 まとめと考察

第三章では武田薬品工業株式会社で創出された MT_2 受容体作動薬 IF1(123) の作用機序を調べるために、IF1 の薬理的解析を実施した。まず 2-[^{125}I] iodomelatonin を用いた結合試験を実施した結果、IF1 のヒト MT_2 受容体に対する K_i 値は 0.0089 ± 0.0013 nM であり、ヒト MT_1 受容体よりも 370 倍親和性が強いことが明らかになった(表 3-1)。これに対して、不眠症治療薬として既に承認・販売されている MT_1/MT_2 受容体作動薬の Ramelteon (図 3-10) はヒト MT_1 受容体に対する親和性がヒト MT_2 受容体よりも 8 倍高いことが知られおり(129)、IF1 は Ramelteon とは異なる選択性プロファイルを有することが確かめられた。IF1 はヒト MT_2 受容体のみならずマウス MT_2 受容体及びラット MT_2 受容体に対しても高い親和性を有しており、その結合は迅速かつ可逆的であることが示された(表 3-1、図 3-4)。

細胞内 cAMP 濃度測定系、ERK1/2 のリン酸化測定系及び β -アレスチンシグナル測定系のいずれにおいても IF1 は部分作動薬として挙動した(図 3-5)。これらの結果は、生理的リガンドのメラトニンや完全作動薬である Ramelteon と比較して、IF1 の内活性が小さいことを示唆するものである。その一方で、IF1 の MT_2 受容体に対する親和性はメラトニンよりも高かった(表 3-1)。また、IF1 によって惹起される cAMP の抑制活性や ERK1/2 のリン酸化活性は PTX 感受性であることから(図 3-5B, C)、cAMP の抑制活性は $G\alpha_i$ タンパク質によって引き起こされ、ERK1/2 シグナル経路は $G\alpha_i$ シグナル経路の下流に位置することが予想された。

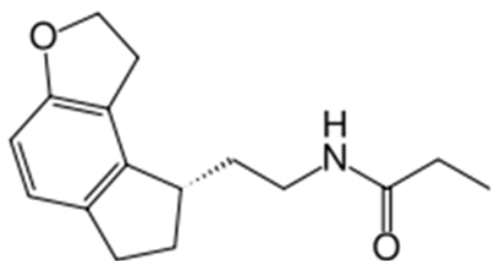


図 3-10 Ramelteon の化学構造式

一般的に β -アレスチンシグナル経路はインターナリゼーションやそれに伴う受容体の脱感作に主に関与すると考えられている(27-29)。従って β -アレスチンシグナルの内活性が小さい IF1 は、メラトニンと比較して引き起こされるインターナリゼーションの強度が小さいことが予測された。そこでこの可能性を検証すべく、本化合物がヒト MT_2 受容体のインターナリゼーションに与える影響を調べた。ヒト MT_2 受容体安定発現細胞に対して 45 nM のメラトニンを 3 時間反応すると、2-[¹²⁵I]iodomelatonin の細胞膜に対する特異的結合量は約 30%低下した(図 3-6)。これは、ヒト MT_2 受容体のインターナリゼーションについて解析した Gerdin らの報告(130)とも概ね一致しており、約 30%のヒト MT_2 受容体がインターナリゼーションによって細胞膜から消失したと考えられる。一方で IF1 処理は、大部分のヒト MT_2 受容体のインターナリゼーションを誘発し、処理後細胞膜に残存するヒト MT_2 受容体は全体の $7.6 \pm 0.59\%$ に留まった(図 3-6)。

そこで化合物の内活性とインターナリゼーションの強度の関係性をより詳細に調べるために、5 種類の IF1 の構造類縁体を同様の方法で評価した。その結果、 β -アレスチンシグナル経路における化合物の内活性や pEC_{50} とインターナリゼーションの強度の間に相関関係は認められず(図 3-7)、従来のセオリーに反して、 β -アレスチンシグナル経路はヒト MT_2 受容体のインターナリゼーションには関与しないことが示唆された。また、PTX で細胞を前処理しても IF1 によって惹起されるインターナリゼーションに変化は認められないことから(図 3-8)、 $G\alpha_i$ シグナル経路や ERK1/2 シグナル経路もヒト MT_2 受容体のインターナリゼーションには関与しないことが推測される。さらに、 $G\alpha_i$ シグナル経路における化合物の内活性や pEC_{50} とインターナリゼーションの強度の間にも相関関係が無かったことも、 $G\alpha_i$ シグナル経路のインターナリゼーションへの関与を否定するものである(図 3-9)。

化合物の内活性とインターナリゼーション/脱感作の強度の相関性については、これまで多くの研究結果によって支持されてきた(131-134)。例えば January らは、 β_2 アドレナリン受容体の部分作動薬は生理的リガンドのアドレナリンと比較し、惹起されるインターナリゼーション/脱感作の強度が弱いと報告している(118)。また、Kovoor らは μ -オピオイド受容体の脱感作の強度は、作動薬の内活性と相関することを示している(119)。その一方で、一部の研究は例外的な現象を報告している。Luk らは内活性は大きいですが、脱感作を起こしにくいカンナビノイド受容体 1(CB1)作動薬を見出し、CB1 作動薬の内活性と脱感作の間に相関関係は無いと結論づけている(135)。Alvarez らは μ -オピオイド受容体を対象とした解析を行い、作動薬の内活性でインターナリゼーションや脱感作の強度を予測することはできない、と報告している(136)。また、Shi らは、ヒスタミン H3 受容体に関する研究を行い、生理的リガンドのヒスタミンよりも強烈的なインターナリゼーションを引き起こす部分作動薬を見出している(137)。こうした知見は、内活性とインターナリゼーションの相関性に関する従来の理解に対して疑問を投げかけるものであり、インターナリゼーションという現象が予想以上に複雑なメカニズムで引き起こされていることを示唆するものである。本章の研究からも、ヒト MT_2 受容体のインターナリゼーションと β -アレスチンシグナル経

路、 $G\alpha_i$ シグナル経路及び ERK1/2 シグナル経路との間に相関関係は認められず、従来のセオリーでは説明できない未知のメカニズムが存在することを示唆する結果となった。IF1 による MT_2 受容体を介したシグナル経路活性化の模式図を図 3-11 に示した。

既存の不眠症治療薬である Ramelteon や栄養補助食品サプリメントとして市販されているメラトニンと比較した際の IF1 の特徴の一つは、 MT_2 受容体に対する高度な選択性である。一般的に MT_1 受容体の活性化は、視交叉上核の神経発火抑制作用と睡眠誘発作用を有するのに対して、 MT_2 受容体の活性化は、生体時計の概日リズム位相を変位させると考えられている(117,118)。従って MT_2 受容体に選択的な IF1 の薬効としては概日リズム位相の変移作用、すなわち睡眠覚醒スケジュールが一般的な社会生活のリズムから大きく逸脱した概日リズム性睡眠障害の治療への適応が期待される。さらに IF1 は MT_1 受容体への作用が少ないため、 MT_1 受容体活性化による強い眠気を生じる危険性が低く、就床時刻以外の時間帯に投与しても大きな問題とならないことがメリットとして挙げられる。概日リズム性睡眠障害はうつ病などの精神障害を引き起こし、社会活動の質を著しく低下させることから深刻な問題となっているが、治療に有効な薬剤は極めて乏しいのが現状であり、IF1 は副作用の少ない概日リズム性睡眠障害に特化した初めての薬剤としての開発が期待される。

IF1 の二つ目の特徴は、部分作動薬でありながら強いインターナリゼーションを引き起こす点である。一般的にインターナリゼーションは受容体の感受性低下、すなわち脱感作を惹起すると考えられており、こうした現象は、薬剤の反復使用の結果、一定容量で得られる効果が現弱する薬物耐性につながると考えられている(138,139)。しかしメラトニン受容体、特に MT_2 受容体の場合は、メラトニン自身がインターナリゼーション及び脱感作を引き起こすことが知られており(130,140)、インターナリゼーション/脱感作の機構が睡眠周期の概日リズムを調節する上で重要な役割を果たすと考えられている。すなわち、夜間に分泌されたメラトニンによって MT_2 受容体は脱感作を受けるため、夜間以外の時間帯で受容体が活性化される可能性が軽減され、このことがメリハリの利いた概日リズムの形成に貢献していると推測される。こうした観点から IF1 の薬剤としての効果を考えると、IF1 によって惹起される強烈なインターナリゼーションはメラトニン同様に脱感作を引き起こすと考えられるため、薬剤投与時にのみ効果を発揮する切れ味の鋭い薬効が期待される。

以上より IF1 は選択性及びインターナリゼーション誘発の観点から、既存の不眠症治療薬とは異なるプロファイルを有していることが明らかとなった。今後はこうした特徴的なプロファイルを生かした安全で有効な概日リズム性睡眠障害治療薬開発に向け、動物モデルでの検証を実施していく予定である。

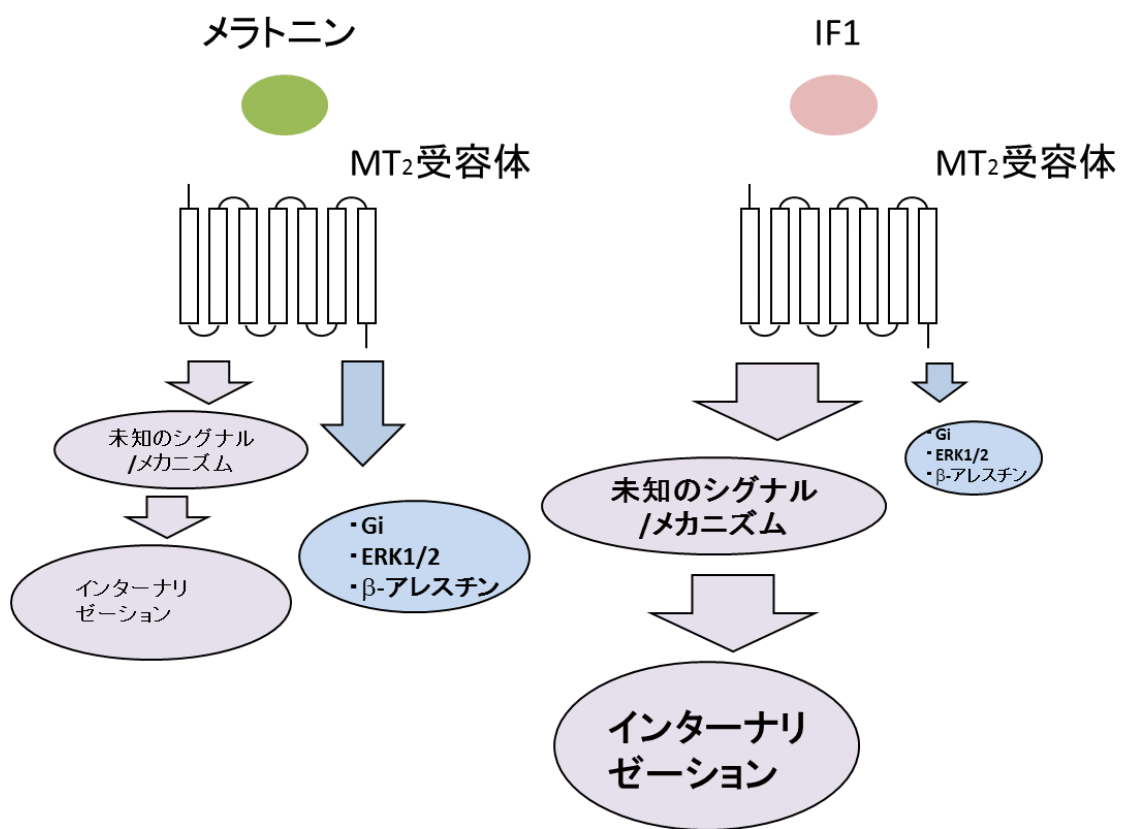


図 3-11 IF1 及びメラトニンによる MT₂受容体を介したシグナル経路活性化の模式図

3-4 実験方法

1) 実験材料

2-[¹²⁵I]iodomelatonin 及びヒト MT₂受容体を安定発現した CHO 細胞(ヒト MT₂受容体安定発現細胞)は PerkinElmer から購入した。これら以外の実験材料は和光純薬から購入した。また、武田薬品工業株式会社で合成された IF1 *N*-(2-(7-benzyl-1,6-dihydro-2H-indeno[5,4-b]furan-8-yl)ethyl)acetamide 及びその構造類縁体の構造を図 3-2 に示した(123)。

2) ヒト MT₂受容体/ β -アレスチン発現細胞の構築

ヒト MT₂受容体をコードした cDNA 断片を pCMV-ProLink プラスミドに挿入し、発現ベクター pCMV-PL/hMT₂ を構築した。この発現ベクターを、CHO-K1-BAEA 細胞に FuGENE 6 Transfection Reagent を用いて導入した。翌日、単一クローンを得るために、細胞を 100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin、500 μ g/ml G418 及び 10% FBS 含有 Ham's F-12 で 10,000 倍希釈し、96 穴プレートに播種した。細胞は 37°C に保温した 5% CO₂ 存在下のインキュベーターで 3 週間培養した。得られたヒト MT₂受容体発現細胞のクローンは、メラトニン刺激で応答を確認した。

3) 2-[¹²⁵I]iodomelatonin を用いた結合試験

ヒト MT₂受容体膜画分の調製及び受容体結合試験は Koike らの報告(123)に従って実施した。5 μ g のヒト MT₂受容体膜画分と評価化合物及び 80 pM の 2-[¹²⁵I]iodomelatonin を 200 μ l の MT₂ binding buffer [1 mM EDTA、0.1% BSA 及び 100 μ g/ml GTP 含有 25 mM Tris-HCl (pH 7.5)] 中で、室温で 2.5 時間反応した。反応液は GF/C フィルタープレートを用いて濾過し、フリーの 2-[¹²⁵I]iodomelatonin を除去した。フィルタープレートを乾燥させた後、Microscint-0 を 25 μ l/well で添加し、放射活性を TopCount liquid scintillation counter を用いて測定した。1 μ M の非標識メラトニンを添加した際の放射活性を非特異的結合とし、全結合量から非特異的結合を差し引いた値を特異的結合とした。

4) 細胞内 cAMP 濃度の測定

細胞内 cAMP 濃度は AlphaScreen cAMP Assay kit を用いて、製品添付のプロトコルに従って測定した。具体的には、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin 及び 10% FBS 含有 Ham's F12 で培養したヒト MT₂受容体安定発現細胞を回収後、1.0 x 10⁶ cells/mL になるように AlphaScreen cAMP assay buffer で懸濁し、10 μ l を 384 穴オプチプレートに添加した。続いて評価化合物及び 4 μ M のフォルスコリンを含む AlphaScreen cAMP assay buffer 10 μ l を添加し、室温で 1 時間反応した。その後、30 μ L の anti-cAMP acceptor beads 及び biotinylated-cAMP/streptavidin donor beads 懸濁溶液を添加し、室温で 2 時間反応した後、

プレートリーダEnvisionで蛍光強度(680 nm, 620 nm)を測定した。PTXの影響を調べる際には、ヒトMT₂受容体安定発現細胞と100 ng/mlのPTXを12時間反応した後に本試験を実施した。メラトニン非存在下での活性を0%、メラトニンの最大活性を100%とし、各化合物の相対活性を算出した。

5) ERK1/2のリン酸化測定試験

ERK1/2のリン酸化はCisbio Bioassays社から購入したCellul'erk (Phospho-Erk1/2) HTRF assayを用いて、製品添付のプロトコルに従って測定した。具体的には、血清飢餓状態で一晚培養したヒトMT₂受容体安定発現細胞を回収し、2.5 x 10⁶ cells/mLになるようにERK1/2 assay buffer (5 mM HEPES及び0.1% BSA含有HBSS)で懸濁した。この懸濁液8 µlを384穴浅底プレートに添加し、続いて評価化合物を含む4 µlのERK1/2 assay bufferを添加した。37°Cに保温した5% CO₂存在下のインキュベーターで5分間反応した後、4 µlのanti-phospho-ERK-d2及びanti-ERK-Eu³⁺ cryptate懸濁溶液を添加した。室温で2時間反応した後、プレートリーダEnvisionで蛍光強度(665 nm, 620 nm)を測定した。PTXの影響を調べる際には、ヒトMT₂受容体安定発現細胞と100 ng/mlのPTXを12時間反応した後に本試験を実施した。メラトニン非存在下での活性を0%、メラトニンの最大活性を100%とし、各化合物の相対活性を算出した。

6) β-アレスチンシグナルの測定

上記2)で構築したヒトMT₂受容体β-アレスチン発現細胞を50 mM HEPES、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、100 µg/ml G418及び10% FBS含有Ham's F-12で培養した後、白色384穴プレートに1.0 x 10⁴ cells/30 µlの密度になるように播種し、37°Cに保温した5% CO₂存在下のインキュベーターで一晩培養した。翌日、培地を除去し、0.1% BSA含有Opti-MEMで溶解した評価化合物を25 µl添加した。37°Cに保温した5% CO₂存在下のインキュベーターで2時間反応した後、12.5 µlのPathHunter detection reagentを添加した。室温で2時間反応した後、プレートリーダEnvisionで発光強度を測定した。メラトニン非存在下での活性を0%、メラトニンの最大活性を100%とし、各化合物の相対活性を算出した。

7) インターナリゼーションの測定

フラスコで培養したヒトMT₂受容体安定発現細胞に、インターナリゼーション buffer (100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin及び0.1% BSA含有Ham's F-12)で懸濁した化合物を添加し、37°Cに保温した5% CO₂存在下のインキュベーターで3時間反応した。細胞を回収後、2-[¹²⁵I]iodomelatoninと5.0 x 10⁴ cells/wellの細胞を200 µlのインターナリゼーション buffer中で、室温で30分間反応した。反応液はGF/Cフィルタープレートを用いて濾過し、フリーの2-[¹²⁵I]iodomelatoninを除去した。フィルタープレートを乾燥さ

せた後、Microscint-0 を 25 μ l/well で添加し、放射活性を TopCount liquid scintillation counter を用いて測定した。化合物未処理の vehicle コントロールの放射活性を 0%、メラトニン処理した際の放射活性を 100%とし、各化合物のインターナリゼーション強度(%)を算出した。

8) データ解析

データ解析は GraphPad Prism5 software を用いて行った。メラトニンの最大活性を 100%として相対活性を計算後、sigmoidal dose-response の式にフィッティングすることで濃度依存曲線を作成し、EC₅₀ 値と内活性(intrinsic activity)を算出した。化合物の結合親和性(*K_i* 値)は下記の式を使って求めた。

$$K_i = IC_{50} / (1 + L / K_d)$$

IC₅₀ 値は 2-[¹²⁵I]iodomelatonin を用いた結合試験系で、50%の阻害を引き起こす化合物濃度である。また *K_d* 値は 2-[¹²⁵I]iodomelatonin の結合親和性(73 pM, data not shown)を、L は結合試験系で使用した 2-[¹²⁵I]iodomelatonin の濃度(80 pM)を示す。

総括

本研究は GPCR を標的とした新規医薬品開発を目的として実施された。既存の医薬品化合物の 30-50%が GPCR に作用すると言われていたことから明らかなように(2-4)、GPCR は医薬品の重要な標的分子であり、現在も GPCR を標的とした研究開発活動が精力的に行われている。その一方で、アロステリックモジュレーターやバイアスアゴニストに代表されるように、GPCR の活性化機構やシグナル伝達機構は従来の古典薬理学で考えられていた以上に複雑であり多様であることが、近年の研究より明らかになってきた(21-23,28,29)。そうした中で、化合物と GPCR の相互作用のメカニズムを分子レベルで明らかにすることは、その化合物の薬理的プロファイルを把握し、薬効や副作用を予測するために、ますます重要になってきている。そこで本研究では、異なる GPCR に作用する三種類のリード化合物を題材として、新規薬剤創出のための一助とすべく、その受容体相互作用に関する分子機構の解明に取り組んだ。

第一章では脂質異常症治療薬を創出するために、脂肪細胞で特異的に発現する乳酸受容体である GPR81 に対する低分子作動薬の探索を行った。細胞内 cAMP 濃度測定系を用いた HTS を実施した結果、ヒット化合物 AT1 (図 1-1)を見出した。続いて、活性向上と物性改善を指向した最適化研究を実施し、リード化合物 AT2 (図 1-1)を創出することに成功した。分子薬理学的手法を用いた *in vitro* プロファイリングで明らかとなった AT2 の最大の特徴は、GPR81 に対して高活性を示す一方で、GPR81 と同じファミリーに属する GPR109a は活性化しない点である(図 1-2)。脂肪細胞における GPR109a の活性化は GPR81 と同様に脂肪分解抑制作用を惹起するため、薬効面では付加的な効果が期待できる。その一方で GPR109a は皮膚のランゲルハンス細胞や角質細胞にも発現していることが知られており、こうした組織での GPR109a の活性化は皮膚紅潮の副作用につながるということが明らかとなっている(30,40-42)。従って脂肪細胞に限定的に発現している GPR81 のみを活性化し、GPR109a は活性化しない AT2 は、皮膚紅潮の副作用を伴わない新規脂質異常症治療薬として理想的なプロファイルを有していると考えられた。更に AT2 は、より生理的条件に近い 3T3-L1 脂肪細胞株において GPR109a の生理的リガンドであるニコチン酸と同程度の脂肪分解抑制活性を発揮した(図 1-4)。また AT2 の構造類縁体である AT1 は生理的リガンド存在下でも GPR81 作動活性に影響が無いことから(図 1-2C)、本化合物はオルソステリックサイトに作用する完全作動薬として挙動することが示唆された。以上より AT2 は活性や作用機序の観点からも *in vivo* 作用の検証に適した化合物であることが示された。そこで動物モデルを使って AT2 の薬効及び副作用を調べた。その結果、AT2 は期待通り、ニコチン酸と同程度まで血中遊離脂肪酸量を減少させる一方で、皮膚紅潮の指標である血流量の増加は引き起こさなかった(図 1-6)。この知見は、GPR81 に選択的な作動薬を創出することで副作用のリスクを回避した新規脂質異常症治療薬を開発する、という当初の研究方針の妥当

性を裏付けるものであり、*in vivo*における薬効や副作用を予測する上で *in vitro*の分子薬理学的解析が果たす役割の重要性を示すものである。

第二章では肥満治療薬開発を目的として、MCHR1拮抗薬MQ1のMCHR1阻害作用の分子機構の解明を試みた。MCHR1はG α_i やG α_q を介した複数のGタンパク質シグナル、更にはGタンパク質非依存的な β -アレスチンシグナルを流すことが知られており(75,77,79,80)、まずこれらのシグナル伝達にMQ1が与える影響を調べた。その結果、平衡状態におけるMQ1のG α_i 、G α_q そして β -アレスチンシグナルに対するIC₅₀値は5.7 ± 1.7 nM、5.2 ± 2.9 nM及び1.7 ± 0.14 nMであり(表2-1)、これらのシグナルを同程度の強さで阻害することが明らかとなった。この事実は、MCHR1のように薬効に関与するシグナル経路が同定されていないGPCRを標的とした薬剤が、確実に*in vivo*で薬効を発揮するためには極めて重要な要素だと考えられる。なぜなら近年、シグナル経路ごとに異なる作用を有するバイアスアゴニストと呼ばれるタイプの化合物の存在が注目を集めており(28,29)、もしMQ1が一部のシグナル経路しか遮断しないバイアスアゴニストであれば、期待される薬効を発揮できない可能性があるからである。この点、MQ1は全てのシグナル経路を遮断するため、拮抗薬として好ましいプロファイルを有していると考えられる。

続いてMQ1の解離速度に関する検討を実施した。細胞ベースの試験及び細胞フリーの[¹²⁵I]MCH-(4-19)結合試験いずれにおいても、MQ1の阻害活性は反応時間を伸ばすことで増強することが明らかとなり(図2-4)、MQ1がMCHR1からゆっくりと解離する化合物であることが示唆された。そこで、ウォッシュアウトが化合物の活性に与える影響を細胞ベースの試験で実施した。その結果、時間依存性が低いMQ2の阻害活性はウォッシュアウトにより大きく減弱するのに対し、MQ1の阻害活性は維持されることが明らかとなり(図2-7)、MQ1の時間依存性は解離速度の遅さが原因であると考察された。そこで次に、化合物の解離速度定数を直接的に求めるために、ASMSを用いた結合試験系を構築した。本試験は化合物とMCHR1膜画分を反応後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより結合化合物とフリーの化合物を分離し、結合化合物量をLC/MS/MSで定量する手法を用いている。この試験で算出されたMQ1の解離速度定数は0.53 ± 0.024 h⁻¹であり、これはMQ2の解離速度定数よりも約5倍遅く、ウォッシュアウト実験(図2-7)や時間依存性試験(図2-4, 2-5)の結果とも整合性のとれた結果となった。薬剤開発の観点から考えられる解離の遅い拮抗薬の最大の利点は、受容体への滞留時間の伸長に伴う薬効持続作用に集約される(88,96,97)。現在までに解離速度の遅い薬剤が多く開発されており、これらの薬剤の多くでその解離速度の遅さが強力な薬効に貢献していることが明らかとなっている(83-85)。MCHR1拮抗薬について詳細な速度論的解析が実施された例はこれまでになく、MQ1は解離速度が遅いことが示された初めてのMCHR1拮抗薬である。他の解離が遅い薬剤と同様に、MQ1も*in vivo*における受容体への滞留時間伸長並びに持続的な薬効が期待できると考えられる。

最後にMQ1の結合部位に関する検証を行った。MCHの濃度依存曲線に与えるMQ1の

影響を平衡状態で調べた結果、MCHの濃度依存曲線はMQ1存在下では、右側にシフトすると共にE_{max}が低下するinsurmountableな阻害様式を示した(図2-10A、表2-3)。対照的にペプチド性拮抗薬は、MCHのE_{max}を低下させることなく、右側へのシフトのみを引き起こした(図2-10C)。一般的に様々な要因がinsurmountableな阻害様式を引き起こすことが知られているが、本試験は平衡状態で実施していることやMQ1には細胞傷害性が認められないことなどから、MQ1のネガティブアロステリックモジュレーターとしての可能性を検証することとした。放射性ラベルした¹²⁵I-MCH-(4-19)を用いた速度論的解析を実施した結果、MQ1は¹²⁵I-MCH-(4-19)の解離速度定数を大きく変化させた(図2-12)。化合物の解離速度定数は、相互作用する受容体の立体構造によって規定される固有の値であり(22)、この定数の変化はアロステリックモジュレーターによるMCHR1の立体構造の変化を示すものである。そこでMQ1とMCHの結合部位が異なることをより直接的に示すために、変異体実験を実施した。変異は、ネガティブアロステリックモジュレーターとの複合体としてGPCRで唯一結晶構造情報があるCRF1Rの情報(41)を参考に、3番目、5番目及び6番目のTMヘリックスの18アミノ酸に導入した(図2-13)。各変異体におけるMCH及びMQ1の活性をβ-アレスチンシグナル測定系で調べた。大部分の変異体はMCHのEC₅₀値に有意な変化を与えなかったことから(表2-5)、これらの変異はMCHR1の立体構造やMCHとの結合に影響を与えないことが示唆された。一方で、3番目のTMヘリックスに位置するAla¹³⁶とHis¹⁴⁷をバリンとアラニンに置換したそれぞれの変異体では、MCHのEC₅₀値には影響を与えることなく、MQ1の阻害活性のみを有意に変化させた(表2-5)。以上より、上記2アミノ酸がMQ1との結合に関与することが示唆され、これはMCHの結合部位とは異なるサイト、すなわちアロステリックサイトに作用することを裏付けるものである。アロステリックサイトを標的とする最大のメリットの一つは、サブタイプや相同性が高い分子に対する選択性獲得が容易になることであり、その結果予期せぬ副作用の回避が可能になる点だとされる(35,36)。そこでMCHR1のサブタイプであるMCHR2を含めた、約100種類の創薬標的分子に対する活性を調べた。MQ1は1 μMでいずれの分子に対しても活性を示さず、際めて選択性の高い化合物であることが示された。MCHR1のアロステリックモジュレーションに関する研究は前例が無く、MQ1はMCHR1のアロステリックサイトに結合することが示された初めての化合物である。アロステリックサイトに結合することで獲得したと考えられるMQ1の様々なプロファイル、すなわち複数シグナルの抑制活性、受容体からの遅い解離、高度な選択性などはいずれも拮抗薬として理想的なプロファイルであり、MQ1がリード化合物としての優れたポテンシャルを有することが証明された。

第三章では睡眠障害治療薬の創出を目的として、MT₂受容体作動薬IF1の受容体活性化機構の分子レベルでの解析を実施した。まず2-¹²⁵I iodomelatoninを用いた結合試験を実施し、IF1の種差及びMT₁受容体に対する選択性を調べた。その結果、IF1はヒト、マウス、ラットいずれの種のMT₂受容体に対しても高い親和性を示す一方で、MT₁受容体に対

しては比較的弱い活性を示した(表 3-1)。例えば、IF1 のヒト MT₂ 受容体に対する結合親和性は 0.0089 ± 0.0013 nM であるのに対し、ヒト MT₁ 受容体に対するそれは 3.3 ± 0.12 nM であり、ヒト MT₂ 受容体に対して 370 倍親和性が強い極めて選択的な作動薬であることが明らかとなった。これに対して、不眠症治療薬として既に承認・販売されている Ramelteon(図 3-10)は、MT₁/MT₂ 受容体共作動薬として知られており、ヒト MT₁ 受容体に対する親和性がヒト MT₂ 受容体よりも 8 倍高いことが報告されている(129)。以上より、IF1 は Ramelteon とは異なる選択性プロファイルを有することが示された。続いて、IF1 のヒト MT₂ 受容体作動活性を調べるために、細胞内 cAMP 濃度測定系、ERK1/2 のリン酸化測定系及びβ-アレスチンシグナル測定系を構築し評価したところ、IF1 はいずれの測定系においても部分作動薬として挙動することが明らかとなった(図 3-5)。これらの結果は、生理的リガンドのメラトニンや完全作動薬である Ramelteon と比較して、IF1 によるヒト MT₂ 受容体活性化の度合いが弱いこと、すなわち IF1 の内活性が小さいことを示唆するものである。また、G α_i タンパク質の阻害剤である PTX を添加すると、IF1 によって引き起こされる cAMP 産生抑制活性や ERK1/2 のリン酸化活性は完全に抑制されることから(図 3-5B, C)、IF1 による cAMP 産生抑制活性は G α_i タンパク質を介していること、さらに ERK1/2 シグナル経路は G α_i シグナル経路の下流に位置することが示唆された。一方で、β-アレスチンシグナル経路に着目すると、同シグナル経路は一般的にインターナリゼーションに関与すると考えられているため(27-29)、同シグナルの内活性が小さい IF1 は、完全作動薬のメラトニンと比較して惹起されるインターナリゼーションの強度が小さいことが予測された。そこでこの可能性を検証するために、IF1 がヒト MT₂ 受容体のインターナリゼーションに与える影響を調べた。ヒト MT₂ 受容体発現細胞膜上の受容体量を 2-[¹²⁵I]iodomelatonin を用いて定量した結果、予想に反して、メラトニンがおよそ 30%のヒト MT₂ 受容体のインターナリゼーションを誘発したのに対し、IF1 は 90%以上のヒト MT₂ 受容体のインターナリゼーションを引き起こした(図 3-6)。そこで IF1 の構造類縁体を用いて、化合物の活性とインターナリゼーション強度の関係性を詳細に調べた。興味深いことに、β-アレスチンシグナル経路における化合物の内活性や pEC₅₀ とインターナリゼーション強度の間には、相関関係が全く認められず、β-アレスチンシグナル経路の活性化はヒト MT₂ 受容体のインターナリゼーションに関与しないことが示唆される結果となった(図 3-7)。これは古典的な GPCR の薬理学的セオリーを逸脱する現象であり、極めて興味深い知見だと考えられる。更にヒト MT₂ 受容体発現細胞を PTX 処理しても IF1 によって惹起されるインターナリゼーションに変化は認められず(図 3-8)、G α_i シグナル経路や ERK1/2 シグナル経路もヒト MT₂ 受容体のインターナリゼーションには関与しないことが示唆された。化合物の内活性がインターナリゼーション強度を規定するというのが従来セオリーに基づく一般的な理解であるが、その一方で例外的な事例も数多く報告されていることも事実である(119-121)。本章の結果からも、β-アレスチンシグナル経路、G α_i シグナル経路及び ERK1/2 シグナル経路のいずれもヒト MT₂ 受容体のインターナリゼーションとの関連性は認められず、古典的な

セオリーでは説明できない未知のメカニズムやシグナル経路の存在が示唆された。

本章で明らかにされたIF1の薬理学的特徴は大きく二つ挙げられる。一点目はMT₂受容体に対する極めて高度な選択性である。一般的にMT₁受容体の活性化は、視交叉上核の神経発火抑制作用と睡眠誘発作用を有すると考えられており(102)、そのためMT₁受容体に作用する薬剤は強い眠気を生じる危険性が危惧される。一方でMT₂受容体の活性化は、生体時計の概日リズム位相変位を引き起こすとされ(103)、そのため概日リズム性睡眠障害の治療への適応が期待される。以上より、MT₂受容体に選択的なIF1は、強い眠気の誘発といった副作用を抑えた、概日リズム性睡眠障害に特化した初めての治療薬としての開発が期待される。IF1の二点目の特徴は、生理的リガンドのメラトニンよりも強いインターナリゼーションを惹起する点である。通常、インターナリゼーションは受容体の感受性低下とそれに伴う薬物耐性を引き起こすと考えられ、ネガティブな要素として取り扱われることが多い(138,139)。しかしメラトニン受容体の場合は、メラトニン自身がインターナリゼーション及び脱感作を引き起こすことが知られており(130,140)、このインターナリゼーション/脱感作の機構がメリハリの利いた睡眠周期の概日リズムを形成する上で重要だと考えられている。従ってメラトニン受容体に作用する作動薬を開発する場合は、IF1の強烈なインターナリゼーションは、薬剤投与直後にのみ効果を発揮するような切れ味の鋭い薬効に貢献する可能性が考えられる。これらの特徴は既存の不眠症治療薬に対する優位性につながると考えられ、今後動物レベルでの検証を実施していく予定である。

以上、本研究の結果から、AT₂、MQ1及びIF1の三化合物が、新規脂質異常症治療薬、肥満治療薬そして睡眠障害治療薬のリード化合物として優れたプロファイルを有していることが明らかとなった。また、創薬探索研究において、*in vitro*の薬理的解析が、*in vivo*における薬効予測や副作用回避のために重要な指針を与えることが明らかとなった。今回の研究で明らかとなったプロファイルを動物レベルそして臨床レベルで実証していくために、更なる研究を実施中である。

参考文献

1. Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schioth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256-1272
2. Drews, J. (2000) Drug discovery: a historical perspective. *Science* **287**, 1960-1964
3. Wise, A., Gearing, K., and Rees, S. (2002) Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug discovery today* **7**, 235-246
4. Overington, J. P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A. L. (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**, 993-996
5. Garland, S. L. (2013) Are GPCRs still a source of new targets? *Journal of biomolecular screening* **18**, 947-966
6. Neves, S. R., Ram, P. T., and Iyengar, R. (2002) G protein pathways. *Science* **296**, 1636-1639
7. Sanchez-Fernandez, G., Cabezudo, S., Garcia-Hoz, C., Beninca, C., Aragay, A. M., Mayor, F., Jr., and Ribas, C. (2014) Galphaq signalling: The new and the old. *Cellular signalling* **26**, 833-848
8. Strathmann, M. P., and Simon, M. I. (1991) G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5582-5586
9. Siehler, S. (2007) G12/13-dependent signaling of G-protein-coupled receptors: disease context and impact on drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* **2**, 1591-1604
10. Milligan, G. (1993) Mechanisms of multifunctional signalling by G protein-linked receptors. *Trends Pharmacol Sci* **14**, 239-244
11. Xu, F., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Jacobson, K. A., Gao, Z. G., Cherezov, V., and Stevens, R. C. (2011) Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* **332**, 322-327
12. Warne, T., Moukhametzianov, R., Baker, J. G., Nehme, R., Edwards, P. C., Leslie, A. G., Schertler, G. F., and Tate, C. G. (2011) The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor. *Nature* **469**, 241-244
13. Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., Leslie, A. G., Tate, C. G., and Schertler, G. F. (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**, 486-491
14. Hanson, M. A., Roth, C. B., Jo, E., Griffith, M. T., Scott, F. L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S. M., Schuerer, S. C., Sanna, M. G., Han, G. W., Kuhn, P.,

- Rosen, H., and Stevens, R. C. (2012) Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* **335**, 851-855
15. Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G. W., Kobayashi, T., Stevens, R. C., and Iwata, S. (2011) Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* **475**, 65-70
 16. Granier, S., Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2012) Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* **485**, 400-404
 17. Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Mathiesen, J. M., Sunahara, R. K., Pardo, L., Weis, W. I., Kobilka, B. K., and Granier, S. (2012) Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **485**, 321-326
 18. Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2008) Structural insights into G-protein-coupled receptor activation. *Current opinion in structural biology* **18**, 734-740
 19. Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., and Kobilka, B. K. (2011) Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549-555
 20. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383-387
 21. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., DeVree, B. T., Rosenbaum, D. M., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R. K., Gellman, S. H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* **469**, 175-180
 22. Milligan, G., and Kostenis, E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British journal of pharmacology* **147 Suppl 1**, S46-55
 23. Reiter, E., and Lefkowitz, R. J. (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **17**, 159-165
 24. Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1986) Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*

25. Shukla, A. K., Westfield, G. H., Xiao, K., Reis, R. I., Huang, L. Y., Tripathi-Shukla, P., Qian, J., Li, S., Blanc, A., Oleskie, A. N., Dosey, A. M., Su, M., Liang, C. R., Gu, L. L., Shan, J. M., Chen, X., Hanna, R., Choi, M., Yao, X. J., Klink, B. U., Kahsai, A. W., Sidhu, S. S., Koide, S., Penczek, P. A., Kossiakoff, A. A., Woods, V. L., Jr., Kobilka, B. K., Skiniotis, G., and Lefkowitz, R. J. (2014) Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature* **512**, 218-222
26. Gurevich, V. V., and Gurevich, E. V. (2004) The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 105-111
27. Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., Peppel, K., Caron, M. G., and Lin, F. T. (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* **286**, 2495-2498
28. Conner, D. A., Mathier, M. A., Mortensen, R. M., Christe, M., Vatner, S. F., Seidman, C. E., and Seidman, J. G. (1997) beta-Arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. *Circ Res* **81**, 1021-1026
29. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**, 1547-1550
30. Xiao, K., Sun, J., Kim, J., Rajagopal, S., Zhai, B., Villen, J., Haas, W., Kovacs, J. J., Shukla, A. K., Hara, M. R., Hernandez, M., Lachmann, A., Zhao, S., Lin, Y., Cheng, Y., Mizuno, K., Ma'ayan, A., Gygi, S. P., and Lefkowitz, R. J. (2010) Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15299-15304
31. DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., and Shenoy, S. K. (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annual review of physiology* **69**, 483-510
32. Luttrell, L. M., and Gesty-Palmer, D. (2010) Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacological reviews* **62**, 305-330
33. Schmid, C. L., and Bohn, L. M. (2009) Physiological and pharmacological implications of beta-arrestin regulation. *Pharmacology & therapeutics* **121**, 285-293
34. Nickols, H. H., and Conn, P. J. (2014) Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. *Neurobiology of disease* **61**, 55-71
35. Christopoulos, A., and Kenakin, T. (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* **54**, 323-374
36. Kenakin, T., and Miller, L. J. (2010) Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity

- on new drug discovery. *Pharmacol Rev* **62**, 265-304
37. Gao, Z. G., and Jacobson, K. A. (2013) Allosteric modulation and functional selectivity of G protein-coupled receptors. *Drug discovery today. Technologies* **10**, e237-e243
 38. Bridges, T. M., Brady, A. E., Kennedy, J. P., Daniels, R. N., Miller, N. R., Kim, K., Breining, M. L., Gentry, P. R., Brogan, J. T., Jones, C. K., Conn, P. J., and Lindsley, C. W. (2008) Synthesis and SAR of analogues of the M1 allosteric agonist TBPB. Part I: Exploration of alternative benzyl and privileged structure moieties. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **18**, 5439-5442
 39. Marlo, J. E., Niswender, C. M., Days, E. L., Bridges, T. M., Xiang, Y., Rodriguez, A. L., Shirey, J. K., Brady, A. E., Nalywajko, T., Luo, Q., Austin, C. A., Williams, M. B., Kim, K., Williams, R., Orton, D., Brown, H. A., Lindsley, C. W., Weaver, C. D., and Conn, P. J. (2009) Discovery and characterization of novel allosteric potentiators of M1 muscarinic receptors reveals multiple modes of activity. *Mol Pharmacol* **75**, 577-588
 40. Mitsukawa, K., Yamamoto, R., Ofner, S., Nozulak, J., Pescott, O., Lukic, S., Stoehr, N., Mombereau, C., Kuhn, R., McAllister, K. H., van der Putten, H., Cryan, J. F., and Flor, P. J. (2005) A selective metabotropic glutamate receptor 7 agonist: activation of receptor signaling via an allosteric site modulates stress parameters in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18712-18717
 41. Hollenstein, K., Kean, J., Bortolato, A., Cheng, R. K., Dore, A. S., Jazayeri, A., Cooke, R. M., Weir, M., and Marshall, F. H. (2013) Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* **499**, 438-443
 42. Kruse, A. C., Ring, A. M., Manglik, A., Hu, J., Hu, K., Eitel, K., Hubner, H., Pardon, E., Valant, C., Sexton, P. M., Christopoulos, A., Felder, C. C., Gmeiner, P., Steyaert, J., Weis, W. I., Garcia, K. C., Wess, J., and Kobilka, B. K. (2013) Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **504**, 101-106
 43. Rajagopal, S., Rajagopal, K., and Lefkowitz, R. J. (2010) Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 373-386
 44. Whalen, E. J., Rajagopal, S., and Lefkowitz, R. J. (2011) Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med* **17**, 126-139
 45. Jacobson, T. A. (2010) A "hot" topic in dyslipidemia management--"how to beat a flush": optimizing niacin tolerability to promote long-term treatment adherence and coronary disease prevention. *Mayo Clin Proc* **85**, 365-379
 46. Richman, J. G., Kanemitsu-Parks, M., Gaidarov, I., Cameron, J. S., Griffin, P., Zheng, H., Guerra, N. C., Cham, L., Maciejewski-Lenoir, D., Behan, D. P., Boatman, D., Chen, R., Skinner, P., Ornelas, P., Waters, M. G., Wright, S. D., Semple, G., and

- Connolly, D. T. (2007) Nicotinic acid receptor agonists differentially activate downstream effectors. *J Biol Chem* **282**, 18028-18036
47. Violin, J. D., and Lefkowitz, R. J. (2007) Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 416-422
48. Ahmed, K., Tunaru, S., and Offermanns, S. (2009) GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxy-carboxylic acid receptors. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 557-562
49. Blad, C. C., Ahmed, K., AP, I. J., and Offermanns, S. (2011) Biological and pharmacological roles of HCA receptors. *Adv Pharmacol* **62**, 219-250
50. Cai, T. Q., Ren, N., Jin, L., Cheng, K., Kash, S., Chen, R., Wright, S. D., Taggart, A. K., and Waters, M. G. (2008) Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 987-991
51. Liu, C., Wu, J., Zhu, J., Kuei, C., Yu, J., Shelton, J., Sutton, S. W., Li, X., Yun, S. J., Mirzadegan, T., Mazur, C., Kamme, F., and Lovenberg, T. W. (2009) Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J Biol Chem* **284**, 2811-2822
52. Ge, H., Weiszmann, J., Reagan, J. D., Gupte, J., Baribault, H., Gyuris, T., Chen, J. L., Tian, H., and Li, Y. (2008) Elucidation of signaling and functional activities of an orphan GPCR, GPR81. *J Lipid Res* **49**, 797-803
53. Wise, A., Foord, S. M., Fraser, N. J., Barnes, A. A., Elshourbagy, N., Eilert, M., Ignar, D. M., Murdock, P. R., Steplewski, K., Green, A., Brown, A. J., Dowell, S. J., Szekeres, P. G., Hassall, D. G., Marshall, F. H., Wilson, S., and Pike, N. B. (2003) Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. *J Biol Chem* **278**, 9869-9874
54. Offermanns, S. (2006) The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 384-390
55. Pike, N. B., and Wise, A. (2004) Identification of a nicotinic acid receptor: is this the molecular target for the oldest lipid-lowering drug? *Curr Opin Investig Drugs* **5**, 271-275
56. Benyo, Z., Gille, A., Kero, J., Csiky, M., Suchankova, M. C., Nusing, R. M., Moers, A., Pfeiffer, K., and Offermanns, S. (2005) GPR109A (PUMA-G/HM74A) mediates nicotinic acid-induced flushing. *J Clin Invest* **115**, 3634-3640
57. Pike, N. B. (2005) Flushing out the role of GPR109A (HM74A) in the clinical efficacy of nicotinic acid. *J Clin Invest* **115**, 3400-3403
58. Benyo, Z., Gille, A., Bennett, C. L., Clausen, B. E., and Offermanns, S. (2006) Nicotinic acid-induced flushing is mediated by activation of epidermal langerhans cells. *Mol Pharmacol* **70**, 1844-1849

59. Cheng, K., Wu, T. J., Wu, K. K., Sturino, C., Metters, K., Gottesdiener, K., Wright, S. D., Wang, Z., O'Neill, G., Lai, E., and Waters, M. G. (2006) Antagonism of the prostaglandin D2 receptor 1 suppresses nicotinic acid-induced vasodilation in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6682-6687
60. Ahmed, K., Tunaru, S., Tang, C., Muller, M., Gille, A., Sassmann, A., Hanson, J., and Offermanns, S. (2010) An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. *Cell metabolism* **11**, 311-319
61. Hanson, J., Gille, A., Zwykiel, S., Lukasova, M., Clausen, B. E., Ahmed, K., Tunaru, S., Wirth, A., and Offermanns, S. (2010) Nicotinic acid- and monomethyl fumarate-induced flushing involves GPR109A expressed by keratinocytes and COX-2-dependent prostanoid formation in mice. *J Clin Invest* **120**, 2910-2919
62. Masuda, Y., Sugo, T., Kikuchi, T., Kawata, A., Satoh, M., Fujisawa, Y., Itoh, Y., Wakimasu, M., and Ohtaki, T. (1996) Receptor binding and antagonist properties of a novel endothelin receptor antagonist, TAK-044 [cyclo[D-alpha-aspartyl-3-[(4-phenylpiperazin-1-yl) carbonyl]-L-alanyl-L-alpha-aspartyl-D-2-(2-thienyl) glyceryl-L-leucyl-D-tryptophyl]disodium salt], in human endothelinA and endothelinB receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **279**, 675-685
63. Lee, G., Elwood, F., McNally, J., Weiszmann, J., Lindstrom, M., Amaral, K., Nakamura, M., Miao, S., Cao, P., Learned, R. M., Chen, J. L., and Li, Y. (2002) T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J Biol Chem* **277**, 19649-19657
64. Low, S., Chin, M. C., and Deurenberg-Yap, M. (2009) Review on epidemic of obesity. *Ann Acad Med Singapore* **38**, 57-59
65. Bray, G. A., and Bellanger, T. (2006) Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine* **29**, 109-117
66. Rodgers, R. J., Tschop, M. H., and Wilding, J. P. (2012) Anti-obesity drugs: past, present and future. *Dis Model Mech* **5**, 621-626
67. Vaughan, J. M., Fischer, W. H., Hoeger, C., Rivier, J., and Vale, W. (1989) Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology* **125**, 1660-1665
68. Presse, F., Nahon, J. L., Fischer, W. H., and Vale, W. (1990) Structure of the human melanin concentrating hormone mRNA. *Mol Endocrinol* **4**, 632-637
69. Bittencourt, J. C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J. L., Vale, W., and Sawchenko, P. E. (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat

- brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* **319**, 218-245
70. Saper, C. B., Chou, T. C., and Elmquist, J. K. (2002) The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* **36**, 199-211
 71. Della-Zuana, O., Presse, F., Ortola, C., Duhault, J., Nahon, J. L., and Levens, N. (2002) Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**, 1289-1295
 72. Ito, M., Gomori, A., Ishihara, A., Oda, Z., Mashiko, S., Matsushita, H., Yumoto, M., Sano, H., Tokita, S., Moriya, M., Iwaasa, H., and Kanatani, A. (2003) Characterization of MCH-mediated obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E940-945
 73. Pereira-da-Silva, M., Torsoni, M. A., Nourani, H. V., Augusto, V. D., Souza, C. T., Gasparetti, A. L., Carvalheira, J. B., Ventrucci, G., Marcondes, M. C., Cruz-Neto, A. P., Saad, M. J., Boschero, A. C., Carneiro, E. M., and Velloso, L. A. (2003) Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology* **144**, 4831-4840
 74. Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pellemounter, M. A., Cullen, M. J., Mathes, W. F., Przypek, R., Kanarek, R., and Maratos-Flier, E. (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* **380**, 243-247
 75. Chambers, J., Ames, R. S., Bergsma, D., Muir, A., Fitzgerald, L. R., Hervieu, G., Dytko, G. M., Foley, J. J., Martin, J., Liu, W. S., Park, J., Ellis, C., Ganguly, S., Konchar, S., Cluderay, J., Leslie, R., Wilson, S., and Sarau, H. M. (1999) Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature* **400**, 261-265
 76. Saito, Y. (2001) [Searching for neurotransmitters as cognate ligands of orphan G protein-coupled receptor: finding receptor for melanin-concentrating hormone]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* **21**, 77-82
 77. Lembo, P. M., Grazzini, E., Cao, J., Hubatsch, D. A., Pelletier, M., Hoffert, C., St-Onge, S., Pou, C., Labrecque, J., Groblewski, T., O'Donnell, D., Payza, K., Ahmad, S., and Walker, P. (1999) The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nat Cell Biol* **1**, 267-271
 78. Shimomura, Y., Mori, M., Sugo, T., Ishibashi, Y., Abe, M., Kurokawa, T., Onda, H.,

- Nishimura, O., Sumino, Y., and Fujino, M. (1999) Isolation and identification of melanin-concentrating hormone as the endogenous ligand of the SLC-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **261**, 622-626
79. Pissios, P., Bradley, R. L., and Maratos-Flier, E. (2006) Expanding the scales: The multiple roles of MCH in regulating energy balance and other biological functions. *Endocr Rev* **27**, 606-620
80. Hawes, B. E., Kil, E., Green, B., O'Neill, K., Fried, S., and Graziano, M. P. (2000) The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. *Endocrinology* **141**, 4524-4532
81. Chen, Y., Hu, C., Hsu, C. K., Zhang, Q., Bi, C., Asnicar, M., Hsiung, H. M., Fox, N., Sliker, L. J., Yang, D. D., Heiman, M. L., and Shi, Y. (2002) Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology* **143**, 2469-2477
82. Marsh, D. J., Weingarh, D. T., Novi, D. E., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Chen, A. S., Guan, X. M., Jiang, M. M., Feng, Y., Camacho, R. E., Shen, Z., Frazier, E. G., Yu, H., Metzger, J. M., Kuca, S. J., Shearman, L. P., Gopal-Truter, S., MacNeil, D. J., Strack, A. M., MacIntyre, D. E., Van der Ploeg, L. H., and Qian, S. (2002) Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3240-3245
83. Cheon, H. G. (2012) Antiobesity effects of melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCH-R1) antagonists. *Handb Exp Pharmacol*, 383-403
84. Luthin, D. R. (2007) Anti-obesity effects of small molecule melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) antagonists. *Life Sci* **81**, 423-440
85. McBriar, M. D. (2006) Recent advances in the discovery of melanin-concentrating hormone receptor antagonists. *Curr Opin Drug Discov Devel* **9**, 496-508
86. Kasai, S., Kamata, M., Masada, S., Kunitomo, J., Kamaura, M., Okawa, T., Takami, K., Ogino, H., Nakano, Y., Ashina, S., Watanabe, K., Kaisho, T., Imai, Y. N., Ryu, S., Nakayama, M., Nagisa, Y., Takekawa, S., Kato, K., Murata, T., Suzuki, N., and Ishihara, Y. (2012) Synthesis, structure-activity relationship, and pharmacological studies of novel melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonists 3-aminomethylquinolines: reducing human ether-a-go-go-related gene (hERG) associated liabilities. *J Med Chem* **55**, 4336-4351
87. Eglen, R. M. (2002) Enzyme fragment complementation: a flexible high throughput screening assay technology. *Assay Drug Dev Technol* **1**, 97-104
88. Copeland, R. A., Pompliano, D. L., and Meek, T. D. (2006) Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 730-739

89. Macdonald, D., Murgolo, N., Zhang, R., Durkin, J. P., Yao, X., Strader, C. D., and Graziano, M. P. (2000) Molecular characterization of the melanin-concentrating hormone/receptor complex: identification of critical residues involved in binding and activation. *Mol Pharmacol* **58**, 217-225
90. Takekawa, S., Asami, A., Ishihara, Y., Terauchi, J., Kato, K., Shimomura, Y., Mori, M., Murakoshi, H., Suzuki, N., Nishimura, O., and Fujino, M. (2002) T-226296: a novel, orally active and selective melanin-concentrating hormone receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* **438**, 129-135
91. Borowsky, B., Durkin, M. M., Ogozalek, K., Marzabadi, M. R., DeLeon, J., Lagu, B., Heurich, R., Lichtblau, H., Shaposhnik, Z., Daniewska, I., Blackburn, T. P., Branchek, T. A., Gerald, C., Vaysse, P. J., and Forray, C. (2002) Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med* **8**, 825-830
92. David, D. J., Klemenhausen, K. C., Holick, K. A., Saxe, M. D., Mendez, I., Santarelli, L., Craig, D. A., Zhong, H., Swanson, C. J., Hegde, L. G., Ping, X. I., Dong, D., Marzabadi, M. R., Gerald, C. P., and Hen, R. (2007) Efficacy of the MCHR1 antagonist N-[3-(1-{[4-(3,4-difluorophenoxy)phenyl]methyl}(4-piperidyl))-4-methylphenyl]-2-methylpropanamide (SNAP 94847) in mouse models of anxiety and depression following acute and chronic administration is independent of hippocampal neurogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* **321**, 237-248
93. Drake, M. T., Violin, J. D., Whalen, E. J., Wisler, J. W., Shenoy, S. K., and Lefkowitz, R. J. (2008) beta-arrestin-biased agonism at the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **283**, 5669-5676
94. Gesty-Palmer, D., Flannery, P., Yuan, L., Corsino, L., Spurney, R., Lefkowitz, R. J., and Luttrell, L. M. (2009) A beta-arrestin-biased agonist of the parathyroid hormone receptor (PTH1R) promotes bone formation independent of G protein activation. *Sci Transl Med* **1**, 1ra1
95. Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A. K., and Lefkowitz, R. J. (2012) Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **52**, 179-197
96. Copeland, R. A. (2010) The dynamics of drug-target interactions: drug-target residence time and its impact on efficacy and safety. *Expert Opin Drug Discov* **5**, 305-310
97. Brinkerhoff, C. J., Choi, J. S., and Linderman, J. J. (2008) Diffusion-limited reactions in G-protein activation: unexpected consequences of antagonist and

- agonist competition. *J Theor Biol* **251**, 561-569
98. Hansson, L. (2001) The relationship between dose and antihypertensive effect for different AT1-receptor blockers. *Blood Press Suppl*, 33-39
 99. Van Liefde, I., and Vauquelin, G. (2009) Sartan-AT1 receptor interactions: in vitro evidence for insurmountable antagonism and inverse agonism. *Mol Cell Endocrinol* **302**, 237-243
 100. Yassen, A., Olofson, E., Romberg, R., Sarton, E., Danhof, M., and Dahan, A. (2006) Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of buprenorphine in healthy volunteers. *Anesthesiology* **104**, 1232-1242
 101. Ojima, M., Igata, H., Tanaka, M., Sakamoto, H., Kuroita, T., Kohara, Y., Kubo, K., Fuse, H., Imura, Y., Kusumoto, K., and Nagaya, H. (2011) In vitro antagonistic properties of a new angiotensin type 1 receptor blocker, azilsartan, in receptor binding and function studies. *J Pharmacol Exp Ther* **336**, 801-808
 102. Ellis, J., and Seidenberg, M. (1992) Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **42**, 638-641
 103. Chaki, S., Funakoshi, T., Hirota-Okuno, S., Nishiguchi, M., Shimazaki, T., Iijima, M., Grottick, A. J., Kanuma, K., Omodera, K., Sekiguchi, Y., Okuyama, S., Tran, T. A., Semple, G., and Thomsen, W. (2005) Anxiolytic- and antidepressant-like profile of ATC0065 and ATC0175: nonpeptidic and orally active melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* **313**, 831-839
 104. Bednarek, M. A., Hreniuk, D. L., Tan, C., Palyha, O. C., MacNeil, D. J., Van der Ploeg, L. H., Howard, A. D., and Feighner, S. D. (2002) Synthesis and biological evaluation in vitro of selective, high affinity peptide antagonists of human melanin-concentrating hormone action at human melanin-concentrating hormone receptor 1. *Biochemistry* **41**, 6383-6390
 105. Foulkes, N. S., Borjigin, J., Snyder, S. H., and Sassone-Corsi, P. (1997) Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends Neurosci* **20**, 487-492
 106. Reiter, R. J. (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* **12**, 151-180
 107. Cassone, V. M. (1990) Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci* **13**, 457-464
 108. Pevet, P., Bothorel, B., Slotten, H., and Saboureau, M. (2002) The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res* **309**, 183-191
 109. Oxenkrug, G. F., and Requintina, P. J. (2003) Melatonin and jet lag syndrome:

- experimental model and clinical implications. *CNS Spectr* **8**, 139-148
110. Petrie, K., Conaglen, J. V., Thompson, L., and Chamberlain, K. (1989) Effect of melatonin on jet lag after long haul flights. *BMJ* **298**, 705-707
 111. Simon, R. D. (2012) Shift work disorder: clinical assessment and treatment strategies. *J Clin Psychiatry* **73**, e20
 112. Lack, L. C., and Wright, H. R. (2007) Clinical management of delayed sleep phase disorder. *Behav Sleep Med* **5**, 57-76
 113. van Geijlswijk, I. M., Korzilius, H. P., and Smits, M. G. (2010) The use of exogenous melatonin in delayed sleep phase disorder: a meta-analysis. *Sleep* **33**, 1605-1614
 114. Reppert, S. M., Weaver, D. R., and Ebisawa, T. (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* **13**, 1177-1185
 115. Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slaugenhaupt, S. A., and Gusella, J. F. (1995) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8734-8738
 116. Morgan, P. J., Barrett, P., Howell, H. E., and Helliwell, R. (1994) Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* **24**, 101-146
 117. Liu, C., Weaver, D. R., Jin, X., Shearman, L. P., Pieschl, R. L., Gribkoff, V. K., and Reppert, S. M. (1997) Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* **19**, 91-102
 118. Dubocovich, M. L., Yun, K., Al-Ghoul, W. M., Benloucif, S., and Masana, M. I. (1998) Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J* **12**, 1211-1220
 119. Dubocovich, M. L., and Markowska, M. (2005) Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* **27**, 101-110
 120. Zhdanova, I. V., Wurtman, R. J., Regan, M. M., Taylor, J. A., Shi, J. P., and Leclair, O. U. (2001) Melatonin treatment for age-related insomnia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **86**, 4727-4730
 121. Hughes, R. J., Sack, R. L., and Lewy, A. J. (1998) The role of melatonin and circadian phase in age-related sleep-maintenance insomnia: assessment in a clinical trial of melatonin replacement. *Sleep* **21**, 52-68
 122. Zhdanova, I. V., Wurtman, R. J., Lynch, H. J., Ives, J. R., Dollins, A. B., Morabito, C., Matheson, J. K., and Schomer, D. L. (1995) Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clinical pharmacology and therapeutics* **57**,

123. Koike, T., Hoashi, Y., Takai, T., Nakayama, M., Yukuhiro, N., Ishikawa, T., Hirai, K., and Uchikawa, O. (2011) 1,6-Dihydro-2H-indeno[5,4-b]furan derivatives: design, synthesis, and pharmacological characterization of a novel class of highly potent MT(2)-selective agonists. *J Med Chem* **54**, 3436-3444
124. Epperson, J. R., Deskus, J. A., Gentile, A. J., Iben, L. G., Ryan, E., and Sarbin, N. S. (2004) 4-Substituted anilides as selective melatonin MT2 receptor agonists. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 1023-1026
125. Mattson, R. J., Catt, J. D., Keavy, D., Sloan, C. P., Epperson, J., Gao, Q., Hodges, D. B., Iben, L., Mahle, C. D., Ryan, E., and Yocca, F. D. (2003) Indanyl piperazines as melatonergic MT2 selective agents. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 1199-1202
126. Nonno, R., Pannacci, M., Lucini, V., Angeloni, D., Fraschini, F., and Stankov, B. M. (1999) Ligand efficacy and potency at recombinant human MT2 melatonin receptors: evidence for agonist activity of some mt1-antagonists. *Br J Pharmacol* **127**, 1288-1294
127. Zlotos, D. P. (2005) Recent advances in melatonin receptor ligands. *Archiv der Pharmazie* **338**, 229-247
128. Osmond, R. I., Sheehan, A., Borowicz, R., Barnett, E., Harvey, G., Turner, C., Brown, A., Crouch, M. F., and Dyer, A. R. (2005) GPCR screening via ERK 1/2: a novel platform for screening G protein-coupled receptors. *J Biomol Screen* **10**, 730-737
129. Kato, K., Hirai, K., Nishiyama, K., Uchikawa, O., Fukatsu, K., Ohkawa, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., and Miyamoto, M. (2005) Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacology* **48**, 301-310
130. Gerdin, M. J., Masana, M. I., Ren, D., Miller, R. J., and Dubocovich, M. L. (2003) Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 931-939
131. Clark, R. B., Knoll, B. J., and Barber, R. (1999) Partial agonists and G protein-coupled receptor desensitization. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 279-286
132. January, B., Seibold, A., Whaley, B., Hipkin, R. W., Lin, D., Schonbrunn, A., Barber, R., and Clark, R. B. (1997) beta2-adrenergic receptor desensitization, internalization, and phosphorylation in response to full and partial agonists. *J Biol Chem* **272**, 23871-23879
133. Kooor, A., Celver, J. P., Wu, A., and Chavkin, C. (1998) Agonist induced homologous desensitization of mu-opioid receptors mediated by G protein-coupled receptor

- kinases is dependent on agonist efficacy. *Mol Pharmacol* **54**, 704-711
134. Su, Y. F., Harden, T. K., and Perkins, J. P. (1980) Catecholamine-specific desensitization of adenylate cyclase. Evidence for a multistep process. *J Biol Chem* **255**, 7410-7419
 135. Luk, T., Jin, W., Zvonok, A., Lu, D., Lin, X. Z., Chavkin, C., Makriyannis, A., and Mackie, K. (2004) Identification of a potent and highly efficacious, yet slowly desensitizing CB1 cannabinoid receptor agonist. *Br J Pharmacol* **142**, 495-500
 136. Alvarez, V. A., Arttamangkul, S., Dang, V., Salem, A., Whistler, J. L., Von Zastrow, M., Grandy, D. K., and Williams, J. T. (2002) mu-Opioid receptors: Ligand-dependent activation of potassium conductance, desensitization, and internalization. *J Neurosci* **22**, 5769-5776
 137. Shi, Y., Sheng, R., Zhong, T., Xu, Y., Chen, X., Yang, D., Sun, Y., Yang, F., Hu, Y., and Zhou, N. (2012) Identification and characterization of ZEL-H16 as a novel agonist of the histamine H3 receptor. *PLoS One* **7**, e42185
 138. Gibelin, P., Bossan, P., Ferrari, E., Drici, M., and Morand, P. (1992) [Treatment of chronic heart insufficiency with dobutamine. Value and limitations]. *Presse Med* **21**, 1680-1684
 139. Haney, S., and Hancox, R. J. (2006) Recovery from bronchoconstriction and bronchodilator tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol* **31**, 181-196
 140. Gerdin, M. J., Masana, M. I., Rivera-Bermudez, M. A., Hudson, R. L., Earnest, D. J., Gillette, M. U., and Dubocovich, M. L. (2004) Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *Faseb j* **18**, 1646-1656

論文目録

本学位論文は下記の発表論文による。

1. Sakurai T, Davenport R, Stafford S, Grosse J, Ogawa K, Cameron J, Parton L, Sykes A, Mack S, Bousba S, Parmar A, Harrison D, Dickson L, Leveridge M, Matsui J, Barnes M. (2014) Identification of a novel GPR81-selective agonist that suppresses lipolysis in mice without cutaneous flushing. *European Journal of Pharmacology* 727:1-7.
2. Sakurai T, Ogawa K, Ishihara Y, Kasai S, Nakayama M. (2014) The MCH 1 receptor, an anti-obesity target, is allosterically inhibited by 8-methylquinoline derivatives possessing subnanomolar binding and long residence times. *British Journal of Pharmacology* 171:1287-1298.
3. Sakurai T, Koike T, Nakayama M. (2014) Pharmacological Characterization of a Highly Selective and Potent Partial Agonist of the MT₂ Melatonin Receptor. *Pharmacology* 93:244-252.

謝辞

本論文を作成するにあたり、ご指導とご高配を賜りました東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 生物有機化学研究室 作田庄平准教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の機会を与えていただき、多大なるご指導とご支援を賜りました武田薬品工業株式会社 医薬研究本部長 丸山 哲行博士、生物分子研究所長 樽井直樹博士、松井純二リサーチマネージャー、中山政治主席研究員に心より厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たり、終始懇切なるご指導を賜りました **Takeda Cambridge Matt Barnes** 博士、**Richard Davenport** 博士に深く感謝致します。

本研究の実施に当たり、共同研究者として多大なるご協力とご助言を賜りました関係者の皆様並びに生物分子研究所の研究員の皆様に心より感謝申し上げます。