



Title	Melanin-concentrating hormone-1受容体占有試験系の確立と中枢性抗肥満薬の作用機序解析
Author(s)	伊藤, 雅彦
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/57942">https://hdl.handle.net/11094/57942</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【25】

氏 名	伊 藤 まさ ひこ
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 4 6 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 22 年 2 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Melanin-concentrating hormone-1 受容体占有試験系の確立と中枢性抗肥満薬の作用機序解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 山 元 弘 (副査) 教 授 松 田 敏 夫 教 授 八 木 清 仁 教 授 堤 康 央

論 文 内 容 の 要 旨

Melanin-concentrating hormone (MCH)は脳内に多く発現しており、様々な中枢性機能に関与していると推測されている。MCHの受容体には2つのG蛋白結合型受容体(G-protein coupled receptor: GPCR)、MCH1受容体(MCH1R)とMCH2受容体(MCH2R)が存在する。少なくともげっ歯類ではその一つであるMCH1Rを介した摂食上昇を伴う肥満形成効果を示すことが知られている。よって、MCH1Rアンタゴニストが抗肥満作用を発揮することが期待される。中枢ターゲットの薬剤の創薬開発を促進するためには、いわゆるPharmacodynamic marker (PDマーカー)が重要である。そこで本論文においては、PDマーカーとして、マウスを用いたMCH1Rアンタゴニストの脳内受容体占有試験 (receptor occupancy study: RO study) のセットアップを試みた。さらに、長期投与による抗肥満効果、及びそのメカニズム解析などを検討した。

最初にMCH1R RO試験のセットアップの目的で、RO試験に必須である放射性標識MCH1Rアンタゴニストのスクリーニング・誘導化を行い、”Compound D”を見出した。Compound Dは*in vitro*での受容体高発現細胞株由来メン

ブランを用いた結合実験において、MCH1Rに対して強い親和性を示すと共に、他のターゲットに対してはほとんど親和性を示さず、MCH1Rへの高い選択性を示した。また、脂溶性が低く、受容体への結合・解離速度が速いなど、ROリガンドとしての有用性が認められた。マウス脳切片への結合実験では、脳線条体への[<sup>35</sup>S]-compound Dの結合が観察され、かつMCH1R欠損マウス脳ではその結合は検出されなかったことから、RO試験へ使用できることが示唆された。

そこで、本標識化合物による*ex vivo* RO試験のセットアップを試みた。標識化合物とは異なる構造のMCH1Rアンタゴニスト投与後の適当な時間に脳を摘出、脳線条体の切片を作製し、*ex vivo*での[<sup>35</sup>S]-compound Dによる結合量を測定した。結果、MCH1Rアンタゴニストの投与量依存的に、[<sup>35</sup>S]-compound Dの脳切片上でのMCH1Rへの結合が阻害され、血中薬物濃度との相関も認められたことから、本*ex vivo* RO試験の有効性が確認された。また、MCH1Rアンタゴニスト投与量 (3, 10, 30 mpk)、及び各時間での脳占有レベルを測定したところ、投与後2時間ではいずれの投与量でも90%以上の高い占有率を示していたが、24時間では高い投与量 (30 mpk)でのみ、90%以上の占有率であった。実際、30 mpkでは肥満モデルマウスへの5日間投与実験で、最も強い効果を示すことが確認されている。この結果は、投与後24時間に亘る恒常的に高い受容体占有率が強い薬効を示すために必要であることを示唆している。さらに、複数のMCH1Rアンタゴニストの投与後24時間での受容体占有率と抗肥満効果の関係を検討したところ、両者間に相関が認められ、本*ex vivo* RO試験がPDマーカーとして有効であることを示すことができた。

次に、MCH1Rアンタゴニストの長期連投による効果を確認するために、高脂肪食誘導肥満マウスにおけるMCH1Rアンタゴニストの1カ月間長期投与による抗肥満効果を検討したところ、各種血中パラメーターの改善を伴う強い抗肥満効果をした。加えて、作用メカニズムを調べる目的で、薬剤非投与だが摂食量を一致させる摂食制限群、いわゆるペアフィーディング群を設定したところ、ペア群での体重減少効果は薬剤投与群に比べて軽微であった。即ち、摂食抑制以外の要因が関与していることが示唆された。実際、薬剤投与群では直腸温、代謝速度の上昇、また褐色脂肪細胞でのエネルギー消費関連遺伝子の増加、肝臓や白色脂肪細胞での脂肪合成・酸化関連遺伝子の変化も認められた。以上の結果は、MCH1Rアンタゴニストが肥満モデルにおいて摂食のみならずエネルギー消費も改善することで、抗肥満効果を発揮していることを示唆している。

上記はMCH受容体としてMCH1Rのみを持つげっ歯類における結果であったが、ヒトを含めた高次動物ではMCH1Rと共にMCH2Rを発現している。MCH2Rの生理的役割は不明であるため、げっ歯類での効果が両受容体を持つヒトにそのまま外挿できるかどうかは不明である。そこでヒトと同様に2つのMCH受容体を持つフェレットにおけるMCH1Rアンタゴニストの抗肥満効果を検討した。フェレットには高脂肪食負荷をかけると共に運動制限下におくことで、通常飼育群に比べて肥満を呈するモデルを作製することができた。この肥満フェレットにおけるMCH1Rアンタゴニストの効果を検討した結果、4日間投与にて摂食・体重の減少が観察された。また断薬後にはその効果は解除された。投与期間中における異常行動なども観察されず、MCH1Rアンタゴニストはげっ歯類のみならず高次動物でも抗肥満効果を示すことが確認できた。

以上、MCH1Rアンタゴニストは摂食のみならず、エネルギー代謝を上げることで抗肥満効果を発揮することを明らかにした。また高次動物での薬効試験より、ヒトにおいても十分に効果を示すことが期待される。一方で、新規*ex vivo* RO試験は非臨床における中枢ターゲットに対する薬物の薬効を定量的に算出することを可能とし、さらには将来のPETへの臨床応用も期待できる。本試験系は創薬開発を進める上で重要なツールとなるであろう。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、肥満改善を目的とした中枢標的薬剤開発における *ex vivo* 受容体占有試験系開発を行うと共に、薬剤の長期連投効果及びその作用機序についての解析結果をまとめたものである。脳に多く発現している神経ペプチドである melanin-concentrating hormone (MCH) は、その受容体の一つである MCH1R を介して中枢性に摂食増進、体重増加作用を示すことが知られており、その拮抗剤が抗肥満効果を有する可能性が指摘されていた。本研究では MCH1R 拮抗剤開発に先立ち、中枢性ターゲットの創薬開発を促進するために必須となる薬力学(PD)マーカーとしての *ex vivo* 受容体占有 (RO) 試験系開発を試みた。RO 試験に必須である放射性標識リガンド探索の目

的で、MCH1R 発現細胞を用いたスクリーニングを実施し高活性かつ高い選択性を有する低分子拮抗剤、compound D を発見した。 [<sup>35</sup>S]-compound D はマウス脳切片への強い結合が観察される一方、MCH1R 欠損マウス脳切片への結合は観察されなかったことから、本標識化合物は優秀な *ex vivo* RO 試験用標識化合物であることが明らかとなった。本標識化合物とは構造の異なる MCH1R 拮抗剤経口投与後の脳切片における *ex vivo* RO 試験では、MCH1R 拮抗剤投与量依存的に [<sup>35</sup>S]-compound D 結合が阻害され、受容体占有率と化合物の血中・脳内濃度との相関も認められた。また MCH1R 拮抗剤各量の投与後の経時的な占有率を測定したところ、投与後2時間ではいずれの投与量でも90%以上の高い占有率を示していたが、24時間では最も強い抗肥満効果を示す高投与量でのみ90%以上であった。複数の MCH1R 拮抗剤投与後24時間での受容体占有率と抗肥満効果にも相関が認められ、本 *ex vivo* RO 試験系がPDマーカーとして有効であることが示された。

次に、MCH1R 拮抗剤の長期連続投与による抗肥満効果を確認するために、高脂肪食誘導肥満マウスに MCH1R 拮抗剤を1ヶ月間投与した。その結果、摂食抑制効果及び各種血中パラメーターの改善を伴う強い抗肥満効果が観察された。同実験において作用機序を調べる目的で、薬剤非投与で薬剤投与群レベルに摂餌量を制限する、いわゆるペアフィーディング群を設定したところ、同群での体重減少効果は薬剤投与群に比較して軽微であった。また薬剤投与群では熱産生量の増加、各末梢臓器でのエネルギー消費関連遺伝子の増加等が認められ、MCH1R 拮抗剤が摂食抑制のみならずエネルギー消費上昇により、抗肥満効果を発揮している機序を明らかにした。

上記検討はいずれも MCH1R のみを発現しているげっ歯類における結果である。故に MCH1R のみならずもう一つの MCH 受容体であり、未だ生理的役割が不明である MCH2R を発現しているヒトを含めた高次動物での MCH1R 拮抗剤の効果は不明である。そのため、両受容体を発現している動物モデルとして用いた高脂肪食負荷・運動制限フェレットにおける MCH1R 拮抗剤の効果を検討したところ、摂食抑制を伴う抗肥満効果が観察された。この結果から、MCH1R 拮抗剤は両受容体を持つ高次動物でも効果を発揮する可能性が示唆された。

以上、*ex vivo* MCH1 受容体占有試験系を開発すると共に、MCH1R 拮抗剤の長期連続投与効果と作用機序を解明した本研究は、大阪大学博士学位（薬学）に値するものと判断した。