

メラトニン受容体作動薬ラメルテオンとそのヒト主代謝物 **M-II** の作用持続性に依存した **MT₁** 受容体シグナルの変化

2016 年

西山 啓次

【目次】

序論.....	1
第1章 ラメルテオンおよびそのヒト主代謝物 M-II のメラトニン受容体に対する作用	
1. 緒言.....	3
2. 方法.....	5
3. 結果.....	9
4. 考察.....	15
第2章 細胞レベルにおけるラメルテオンおよび M-II の作用持続性	
1. 緒言.....	17
2. 方法.....	18
3. 結果.....	23
4. 考察.....	33
第3章 ラット膵β細胞株 INS-1 におけるラメルテオンの処置時間依存的な細胞内シグナルの変化	
1. 緒言.....	35
2. 方法.....	36
3. 結果.....	40
4. 考察.....	48
総括.....	51
引用文献.....	52
謝辞.....	59

【序論】

メラトニンは松果体から分泌されるホルモンであり、目から入る光によってその合成が阻害されるため、その血中濃度は日中低く、夜間に高い日内リズムを示す。その生理機能として、睡眠覚醒サイクルのような概日リズムの位相調節や哺乳類の季節繁殖の制御が知られている [1-3]。また、ヒトメラトニンの夜間分泌の増加と眠気の始まりが高い相関を示すのに加え、メラトニン投与による睡眠誘発作用から睡眠における重要な役割が示唆されている [4, 5]。このようなメラトニンの生理機能に基づき、これまでにいくつかの合成メラトニン受容体作動薬が開発されており、不眠症治療薬としてラメルテオン、抗うつ薬としてアゴメラチン、非 24 時間睡眠覚醒障害の概日リズムの同調薬としてタシメルテオンが使用されている [6-8]。

メラトニンの生理機能は Gi タンパク質共役型受容体であるメラトニン受容体 MT₁ および MT₂ への結合を介しており、アデニル酸シクラーゼ活性が低下することで cAMP 産生を抑制する [9, 10]。その他の細胞内シグナル伝達として、ERK1/2、PKC、cGMP などの活性化が報告されている [11-13]。MT₁ 受容体は概日リズム産生の主要部位である視床下部の視交叉上核 (SCN) に高発現しており、MT₁ KO マウスの知見から SCN の神経発火抑制に関与している [14]。一方、MT₂ 受容体は SCN の神経発火リズムの位相変化に重要な役割をもつ [15]。また、ヒト MT₁ および MT₂ 受容体は網膜や膵島などの末梢組織にも発現している [10, 16, 17]。

メラトニン受容体作動薬ラメルテオンは不眠症治療薬として開発され、サルおよびヒトにおいて入眠までの時間を短縮 (睡眠誘発作用) し、総睡眠時間を延長した [8, 18]。また、GABA_A 受容体作動薬である従来の睡眠薬に比べ、ラメルテオンは学習記憶障害、運動障害、薬物依存性、反跳性不眠などの副作用をほとんど示さず、安全性に優れていた [19, 20]。メラトニンも睡眠誘発作用を有するが、総睡眠延長作用については必ずしも一致した結果が得られておらず、その短い血中半減期 (1 時間未満) が起因すると考えられている [21-23]。ラメルテオンの血中半減期は約 1-2 時間であり、その主代謝物 M-II は約 2-4 時間とラメルテオン本体より長かった。また、M-II の血中濃度レベル (AUC₀) はラメルテオン本体よりも約 30 倍以上高かった [24]。これらのことからラメルテオンの睡眠誘発作用には、比較的半減期の短いラメルテオン本体による一過性の受容体刺激が寄与し、より半減期の長いヒト主代謝物 M-II が持続的に受容体を刺激することで、総睡眠時間の延長作用をもたらしている可能性がある。また、薬剤の標的分子への作用持続時間は、薬物動態だけでなく、標的分子や細胞膜との結合様式にも依存する [25, 26]。しかしながら、総睡眠時間の延長作用への寄与が推定される作用持続性に関して、ラメルテオンおよび M-II ともに明らかになっていない。また、作用持続時間に依存した細胞内シグナルの変化や、作動活性消失後の変化についても不明である。これらの作用持続性やメラトニン受容体への持続刺激に伴う細胞内シグナルの変化に関する知見は、*in vivo* におけるラメルテオンの薬効の理解や 2 型糖尿病などの新たな適応症を検討するうえで有益である。

本研究において、ラメルテオンと M-II の MT₁ 受容体シグナルの持続性と、それに伴う細胞内シグナル伝達の変化を明らかにするため、第一章ではラメルテオンおよび M-II のメラトニン受容体に対する作用を検討し、第二章では細胞レベルにおけるラメルテオンおよび M-II の作用持続性およびその寄与因子を調べた。さらに第三章では、ラメルテオンの 2 型糖尿病治療薬としての可能性を検討するため、内臓性 MT₁ 受容体を発現するラット膵 β 細胞株 INS-1 を用いて、持続的な受容体刺

激およびその除去に伴う糖代謝関連の細胞内シグナルの変化（インスリン分泌量および時計遺伝子発現変動）を解析した。

第1章 ラメルテオンおよびそのヒト主代謝物 M-II のメラトニン受容体に対する作用

【緒言】

ヒトや動物モデルにおける薬効用量の推定および薬効の理解には、*in vitro* における薬剤標的分子への親和性、活性および選択性の測定が必要である。ラメルテオンはヒト、サルおよびネコにおいて総睡眠量を増加させ、さらにヒトやサルにおいては睡眠潜時を短縮した [8, 18, 27]。また、ラメルテオンは既存睡眠薬である GABA_A 受容体作動薬にて報告されている REM 睡眠量の減少を引き起こさず、自然睡眠に近い睡眠パターンを示した [18, 28]。その他、ラットにおいて概日リズムの再同調を促進した [29]。これらラメルテオンの薬理作用はメラトニンと類似しており、MT₁ および MT₂ 受容体を介していると推定される。そのため、各動物種の MT₁ および MT₂ 受容体への親和性、作動活性および選択性を調べ、メラトニンと比較することは重要である。

ヒト MT₁ と MT₂ 受容体間のアミノ酸レベルでの相同性は約 60% と低く、メラトニンは MT₁ 受容体に対して MT₂ 受容体よりも高親和性を示すといった異なる結合特性を示す [10]。ラット MT₁、MT₂ 受容体は各ヒト型受容体に対してアミノ酸レベルでそれぞれ約 84、79% の相同性であり、一部の化合物群においてヒトとラット受容体間に大きな親和性の差が報告されている [30]。サル MT₁、MT₂ 受容体の特性は明らかになっていないが、サルはげっ歯類とは異なり昼行性の動物であり、休息期においてメラトニンの分泌が高まる。さらに、サルはヒト同様、ラメルテオンによる睡眠誘発作用と総睡眠量増加作用の両方を示す動物種であることから、メラトニン受容体作動薬の睡眠促進作用の機序理解に適した動物モデルと言えるであろう。このような観点から、サル MT₁、MT₂ の受容体特性や、ラメルテオンの各受容体に対する親和性も明らかにしておく価値がある。

薬剤の標的分子に対する選択性は、薬剤の副作用の観点からも検討すべき試験のひとつであり、薬剤の非標的分子に対する親和性や活性はリコンビナント蛋白質などを用いた網羅的な解析が可能である。メラトニンの結合部位として 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンに対する平衡解離定数 (K_D) が約 10-100 pM の高親和性 MT₁、MT₂ 受容体以外に、当初 MT₃ 結合部位と言われていたナノモルオーダーの低親和性を示す Quinone reductase 2 という酸化還元関連酵素が同定されている [31]。本酵素は腎臓や肝臓などの末梢組織にも発現し、メラトニンによる細胞保護作用への関与が示唆されている一方、睡眠促進作用には寄与しないと考えられている [32]。

ラメルテオンは肝臓において主に酸化により代謝され、M-I、M-II、M-III、M-IV などのヒト血中代謝物が同定されている [24]。なかでも M-II はヒト MT₁、MT₂ 受容体に対する親和性があり、前述のように未変化体よりも半減期が長く、暴露量も約 30 倍以上多いことからラメルテオンの薬効に関与する可能性が高い。しかしながら、M-II のメラトニン受容体に対する詳細な活性および選択性、ならびに *in vivo* における有効性は明らかになっていない。

本章においてラメルテオンと M-II のヒト MT₁、MT₂ 受容体に対する親和性および作動活性を調べるため、ヒト MT₁ および MT₂ 受容体発現チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いて、受容体結合試験およびフォルスコリン誘発 cAMP 産生の抑制試験を行った。ラメルテオンについてはサル MT₁ および MT₂ 受容体に対する作用を同様の試験で実施し、標的脳部位と考えられる SCN に対する親和性を調べた。また、ラメルテオンと M-II の MT₁、MT₂ 受容体に対する選択性を

明らかにするため、Quinone reductase 2 ならびに各種受容体、イオンチャネルおよび酵素に対する作用を検討した。さらに M-II の *in vivo* における睡眠促進作用を確認するため、ネコにおける睡眠脳波測定を行った。

【方法】

1. 試薬

ラメルテオン ((S)-N-[2-(1,6,7,8-tetrahydro-2H-indeno[5,4-b]furan-8-yl)ethyl]propionamide) および M-II ((2S)-2-hydroxy-N-[2-[(8S)-1,6,7,8-tetrahydro-2H-indeno[5,4-b]furan-8-yl]ethyl]propionamide) は武田薬品工業株式会社 (Osaka, Japan) にて合成された (Fig. 1)。メラトニンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から、2-ヨードメラトニンは Tocris Cookson Ltd. (Bristol, UK) から購入した。2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンは PerkinElmer Inc. (Waltham, MA, USA) から入手した。cAMP [¹²⁵I] assay system および cAMP Enzyme immunoassay Biotrack system は GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK) から購入した。

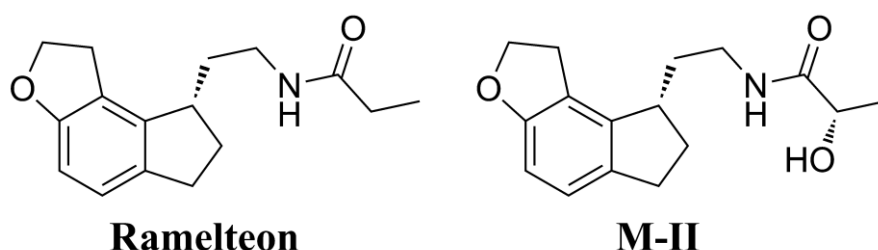


Fig. 1. Chemical structures of ramelteon and M-II

2. 使用動物

ネコ脳波測定試験には、8匹のネコ (雄4-6匹、雌2-4匹、体重2.4-5.9 kg、Keari, Osaka, Japan) のネコを使用した。22-26 °C に維持された部屋において、12時間明暗サイクル下 (午前7時から午後7時までで明期)、1日1回の給餌 (午前9時) を行い、自由飲水下で飼育した。サル SCN の採取には、12匹のカニクイザル (*Macaca fascicularis*、雄9匹、雌3匹、体重2.8-6.6 kg) を使用した。Quinone reductase 2 に対する結合試験には、シリアンハムスター (雄、7-8 週齢、SLC, Japan) を使用した。いずれの動物も武田動物実験委員会の許可のもと、倫理基準に従って飼育し、試験に供した。

3. ヒト MT₁、MT₂ 受容体発現 CHO 細胞の細胞膜調製

ヒト MT₁、MT₂ 受容体安定発現 CHO 細胞株を取得するため、dhfr 欠失 CHO 細胞株 (MT₁) および CHO-K1 細胞 (MT₂) にそれぞれ各遺伝子を発現するベクターを導入し、透析済み血清 (MT₁) もしくはジェネティシン存在下 (MT₂) で培養することによって各受容体を安定的に発現する細胞株を選択した。各細胞株は 10% ウシ胎児血清含有 MEM- α 培地 (MT₂ 受容体発現細胞は 300 μ g/mL ジェネティシン添加) を用いて 5% CO₂ 気層下にて培養した。MT₁ 発現細胞株 (CHO-hMT₁) は 5 mM エチレンジアミン 4 酢酸 (EDTA) 含有ハンクス緩衝液 (Ca⁺、Mg²⁺非含有) を用いて剥がし、細胞を回収した後、50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.7) 中においてホモジナイズしてから遠心した。この洗浄操作を 2 回繰り返すことによって細胞膜を得た。MT₂ 発現細胞株 (CHO-hMT₂) はダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中にて細胞を回収してから、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6) を用いて CHO-hMT₁ と同様のホモジナイズ、遠心操作により細胞膜を取得した。細胞膜はいずれ

も使用時まで、-30 もしくは-80°C にて保存した。

4. サル MT₁、MT₂ 受容体発現 CHO 細胞およびサル SCN の細胞膜調製

サル MT₁ および MT₂ 受容体の一過性発現 CHO 細胞は、リポフェクトアミン 2000 (Invitrogen) を用いた CHO-KI 細胞への各受容体遺伝子発現ベクターの導入により得た。その後、1 mM EDTA 含有 PBS により細胞を剥がして回収し、細胞膜の調製時まで-80°C 下で保存した。サル SCN は 12 匹分のサル脳から単離して凍結保存した。SCN 由来細胞膜は 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.7) 中においてホモジナズと遠心 (40000×g、20 分、4°C) を 2 回繰り返すことにより得た。

5. Quinone reductase 2 を含むハムスター脳ホモジネートの調製

シリアンハムスター (7-8 週齢、SLC、日本) から全脳を摘出し、試験時まで 0.32 M スクロース溶液に浸して保存した。結合試験時に、全脳を 20-30 倍用量の 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中においてホモジナイズしてから遠心 (48000×g、10 分、4°C) した。そのペレットを 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) により 2 回洗浄してから結合試験に用いた。

6. 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニン結合試験

ヒト MT₁、MT₂ 受容体に対するメラトニン受容体作動薬の競合結合試験は以下のように実施した。アッセイバッファーとして 50 mM トリス塩酸緩衝液 (MT₁、pH 7.7、MT₂、pH 7.6) を用いて、CHO 細胞膜、試験化合物、2-[¹²⁵I]ヨードメラトニン (MT₁、40 pM、MT₂、280 pM) を希釈し、試験管に順番に加えて総量 1 mL の反応液を調製した。飽和結合試験には各濃度の 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニン (MT₁、5-80 pM、MT₂、99-6350 pM) を使用した。25°C 下 150 分間反応させた後、氷冷した 3 mL のアッセイバッファーを加えてワットマン GF/B フィルターへ吸引濾過し、反応を停止させた。その後、素早く 3 mL のアッセイバッファーで 2 回フィルターを洗浄した。非特異的結合の検出にはそれぞれ 10 μM (MT₁)、100 μM (MT₂) のメラトニンを添加した。放射活性は γ カウンターにより測定した。

サル MT₁、MT₂ 受容体および SCN に対するメラトニン受容体作動薬の競合結合試験はヒト受容体と同様の手順に従い、アッセイバッファーとして 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.7) を用いて、細胞膜、試験化合物、2-[¹²⁵I]ヨードメラトニン (CHO、40 pM、SCN、60 pM) を希釈し、順番に試験管へ加えて総量 0.5 mL の反応液を調製した。飽和結合試験には各濃度の 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニン (6.25-800 pM) を使用した。25°C 下 120 分間反応させた後、氷冷した 4 mL のアッセイバッファーを加えてワットマン GF/B フィルターへ吸引濾過し、反応を停止させた。その後、素早く 4 mL のアッセイバッファーで 2 回フィルターを洗浄した。非特異的結合の検出にはそれぞれ 10 μM (CHO)、1 μM (SCN) のメラトニンを添加した。放射活性は γ カウンターにより測定した。

ハムスター脳由来 Quinone reductase 2 に対するメラトニン受容体作動薬の競合結合試験は、Niles ら (1987) の方法を少し変更して行った [33]。アッセイバッファーとして 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を用い、ハムスター脳ホモジネート、試験化合物および 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニン (100 pM) を順番に試験管へ加えて総量 0.25 mL の反応液を調製した。4°C 下 60 分間反応させた後、氷冷した 3 mL のアッセイバッファーを加えてワットマン GF/B フィルターへ吸引濾過し、反

応を停止させた。その後、素早く 3 mL のアッセイバッファーで 2 回フィルターを洗浄した。非特異的結合の検出には 100 μ M のメラトニンを添加した。放射活性は γ カウンターにより測定した。

7. cAMP 産生阻害試験

ヒト MT₁、MT₂ 受容体安定発現 CHO 細胞は 10% ウシ胎児血清含有 MEM- α 培地 (MT₂ 受容体発現細胞のみ 500 μ g/mL ジェネティシン添加) を用いて、それぞれ 12 ウェルプレート (CHO-hMT₁、 5×10^4 細胞/ウェル) にて 3 日間もしくは 96 ウェルプレート (CHO-hMT₂、 4×10^4 細胞/ウェル) にて 1 日間培養した。試験前にアッセイバッファー (HEPES を含むハンクス緩衝液) で細胞を 2 回洗浄後、3-イソブチル-1-メチルキサンチン (MT₁、10 μ M、MT₂、100 μ M) を含むアッセイバッファーおよび試験化合物を添加し、37 °C 下 6 分間前処置した。次いでフォルスコリン (1 μ M) を添加し、37 °C 下 15 分間反応させた。それぞれ過塩素酸 (CHO-hMT₁) もしくは細胞溶解液 (CHO-hMT₂) にて反応を停止後、cAMP [¹²⁵I] assay system (GE Healthcare、USA) もしくは cAMP Enzyme immunoassay Biotrack system (GE Healthcare、USA) を用いて cAMP 含量を測定した。

8. ラメルテオン、M-II の選択性試験

ラメルテオン、M-II の各種受容体、イオンチャネル (Table 3) 、および酵素 (Table 4) に対する作用を調べるため、MDS pharma Services (Taiwan) の標準プロトコールに基づき、結合もしくは活性阻害を検討した。10 μ M のラメルテオン、M-II を用いて試験後、50% 以上の阻害活性が認められた場合は、複数の濃度を用いて IC₅₀ 値を算出した。

9. ネコ脳波測定試験

ネコの睡眠脳波を測定するため、麻酔下のネコに脳波記録用電極、眼窩骨に眼電図用電極、さらに背側頸部筋肉内に筋電図記録用ステンレス線を埋め込んだ。これら慢性電極埋め込みから少なくとも 1 週間経過後から、ネコを脳波測定ケージ (65 \times 35 \times 45 cm) に入れ、ケージおよび脳波測定操作への馴化を行った。投与する M-II は 0.5% (w/v) メチルセルロース蒸留水溶液により懸濁後、体重 1 kg 当たり 0.1 mL の容量になるようにゼラチンカプセルに充填し、経口投与を行った。このような投与はネコに対するストレスが最小限になるように専門家が実施した。全ての試験は、M-II 群と溶媒群の 2 群で構成された 2 剤 2 期のクロスオーバーデザインで実施した。試験間隔は少なくとも 7 日以上あけた。午前 9 時 55 分から午前 10 時の間に M-II (0.001、0.01、0.1 もしくは 1 mg/kg) もしくは溶媒の投与を行い、直ちに脳波測定を開始し、8 時間測定した。シグナルはポリグラフ (Nihondenki-Sanei、Osaka、Japan) を用いて増幅し、フィルターを通して磁気ペン記録装置により記録した。脳波パワースペクトル分析は Fast Fourier Transform system を使用して実施した。睡眠ステージは 1 分毎に覚醒 (Wakefulness)、ノンレム睡眠 (Non-rapid eye movement sleep: NREMS) 、レム睡眠 (Rapid eye movement sleep: REMS) に分類した。

10. データ解析

結果は平均値 \pm 標準誤差で表した。ヒト MT₂ 受容体における cAMP 産生阻害活性のみ、2 回の独立した試験の平均値および 95% 信頼限界区間で示した。受容体結合および cAMP 産生阻害の IC₅₀

は非線形ロジスティック回帰分析により算出した。Ki は Cheng と Prusoff の式に従い、IC₅₀、K_D、使用ラベル体濃度から算出した。ネコにおける睡眠量の変化は二元配置分散分析を行った後、ホルム補正を伴う paired-t 検定により、処置群間の有意差を検定した。有意水準を P < 0.05 とした。

【結果】

2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの飽和結合試験から、本試験に使用したヒト MT₁、MT₂ 安定発現細胞およびハムスター脳由来 Quinone reductase 2 の K_D はそれぞれ 15.0 ± 3.0 (MT₁)、328 ± 3.0 (MT₂)、900 ± 89 (Quinone reductase 2) pM であり、これまでの報告通り MT₁、MT₂、Quinone reductase 2 の順に 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの親和性が高かった。また、最大受容体結合量 (B_{max}) はそれぞれ 555 ± 114 (MT₁)、133 ± 2 (MT₂)、80.3 ± 6.6 (Quinone reductase 2) fmol/mg protein であった。ヒト MT₁ 受容体において、ラメルテオンはメラトニンより約 6 倍高い親和性、約 4 倍高い cAMP 産生抑制活性を示した (Table 1)。同様に、ヒト MT₂ 受容体においてもラメルテオンはメラトニンより約 3 倍高い親和性、約 17 倍高い作動活性を示した。2-ヨードメラトニンはいずれの受容体に対しても、ラメルテオンとほぼ同程度の親和性、作動活性を有した。一方、ハムスター Quinone reductase 2 に対して、ラメルテオンはメラトニン、2-ヨードメラトニンよりもそれぞれ約 110 倍、2700 倍低い親和性を示した。M-II についても別途、同じ受容体結合および作動活性試験を行い、対照化合物としてラメルテオンとメラトニンを使用した (Table 2)。M-II のヒト MT₁ 受容体に対する親和性は、メラトニンの約 3 倍、ラメルテオンの約 10 倍低く、これと一致して作動活性もメラトニンの約 4 倍、ラメルテオンの約 17 倍低かった。ヒト MT₂ 受容体に対しても同様に、M-II はメラトニンの約 1.5 倍、ラメルテオンの約 5 倍低い親和性を示し、作動活性もメラトニンの約 1.6 倍、ラメルテオンの約 28 倍低かった。一方、M-II の Quinone reductase 2 に対する親和性は 10 μM の濃度においても検出されず、ラメルテオンよりもさらに低かった。

Table 1 Binding affinity (K_i) and functional potency (IC₅₀) of ramelteon, melatonin and 2-iodomelatonin for human MT₁ and MT₂ receptors and hamster quinone reductase 2

Compound	K _i (pM)		K _i (nM)	IC ₅₀ (pM)	
	hMT ₁	hMT ₂	Quinone reductase 2	hMT ₁	hMT ₂
Ramelteon	14.0 ± 0.5	112 ± 5	2650 ± 180	21.2 ± 0.5	53.4 ^a (40.7–70.3)
Melatonin	80.7 ± 2.1	383 ± 5	24.1 ± 0.5	77.8 ± 14.6	904 ^a (714–1150)
2-Iodomelatonin	13.1 ± 0.3	188 ± 4	0.964 ± 0.015	26.8 ± 7.5	60.7 ^a (44.0–83.9)

Each value represents the mean of three experiments with the S.E.M. ^aIC₅₀ values in the functional assay were calculated from 2 independent experiments performed in triplicate. Numbers in parentheses indicate 95% confidence intervals of IC₅₀ values. These data are cited from our previous report (*Neuropharmacology*, **48**, 301-310 (2005), Table 3–6).

Table 2 Binding affinity (K_i) and functional potency (IC₅₀) of M-II, ramelteon and melatonin for human MT₁ and MT₂ receptors and hamster quinone reductase 2

Compound	K _i (pM)		K _i (nM)	IC ₅₀ (pM)	
	hMT ₁	hMT ₂	Quinone reductase 2	hMT ₁	hMT ₂
M-II	114 ± 12.5	566 ± 13.1	>9000	208 (60.4–850)	1470 (930–2380)
Ramelteon	11.6 ± 0.866	112 ± 5.35 ^a	4780 ± 832	12.4 (10.9–14.3)	53.4 ^a (40.7–70.3)
Melatonin	45.4 ± 4.11	383 ± 4.99 ^a	N.D.	48.1 (36.9–63)	904 ^a (714–1150)

Each value represents the mean of three experiments with the S.E.M. IC₅₀ values in the functional assay were calculated from 2 independent experiments performed in triplicate. Numbers in parentheses indicate 95% confidence intervals of IC₅₀ values. ^aThe affinities and potencies of ramelteon and melatonin for MT₂ receptors were cited from Table 1. These data are cited from our previous reports (*Neuropharmacology*, **48**, 301-310 (2005), Table 3 and 6; *Pharmacology*, **93**, 197-201 (2014), Table 1).

ラメルテオンの MT₁、MT₂ 受容体に対する選択性を明らかにするため、各種受容体、イオンチャネル (Table 3) および酵素 (Table 4) に対する結合もしくは活性阻害を検討した。10 μM の濃度において、ラメルテオンはいずれの受容体、イオンチャネルに対しても 50 % 以上の結合阻害活性を示さなかった。M-II においては、さらに 30 種ほど追加した分子群に対して同様の選択性試験を行った結果、5-HT_{2B} 受容体に対してのみ結合阻害活性を示した。しかし、その親和性を示す K_i は 1.75 ± 0.23 μM であり、MT₁、MT₂ 受容体に対する親和性よりもそれぞれ約 15000、3000 倍弱かった。また、10–1000 μM のラメルテオン、M-II は各種酵素に対して阻害活性を示さなかった。

Table 3 List of receptors for which the affinity of ramelteon was examined

Receptor	Receptor	Receptor
Adenosine A ₁	Epidermal growth factor (EGF)	Neurokinin NK ₁
Adenosine A _{2A}	Estrogen	Neurokinin NK ₂
Adenosine A ₃	GABA transporter	Neurokinin NK ₃
Adenosine transporter	GABA _A	Neuropeptide Y ₁
Adrenergic α _{1A}	GABA _A (benzodiazepine, central)	Neuropeptide Y ₂
Adrenergic α _{1B}	GABA _A (benzodiazepine, peripheral)	Neurotensin
Adrenergic α ₁	GABA _A (chloride channel)	Nicotinic (central)
Adrenergic α _{2A}	GABA _B	Opiate δ
Adrenergic α _{2B}	Galanin	Opiate κ
Adrenergic α _{2C}	Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)	Opiate μ
Adrenergic α ₂	Glucocorticoid	Opiate (non-selective)
Adrenergic β ₁	Glutamate (AMPA)	Phorbol ester
Adrenergic β ₂	Glutamate (kainate)	Platelet activating factor (PAF)
Adrenergic β ₃	Glutamate (NMDA)	Platelet derived growth factor (PDGF)
Adrenergic β (non-selective)	Glutamate (NMDA, glycine)	Potassium channel (K _A)
Adrenergic NE transporter	Glutamate (NMDA, PCP)	Potassium channel (K _{ATP})
Angiotensin AT ₁	Glutamate (NMDA, polyamine)	Potassium channel (K _v)
Angiotensin AT ₂	Glutamate (non-selective)	Potassium channel (SK _{Cn})
Atrial natriuretic factor (ANF)	Glycine (strychnine)	Progesterone
Bombesin	Histamine H ₁ (central)	Purinergic P _{2x}
Bradykinin B ₁	Histamine H ₁ (peripheral)	Rolipram
Bradykinin B ₂	Histamine H ₂	Serotonin 5-HT ₁ (non-selective)
Calcitonin	Histamine H ₃	Serotonin 5-HT _{1A}
Calcitonin gene related peptide (CGRP)	Imidazoline I ₂ (central)	Serotonin 5-HT _{1B}
Calcium channel (L type, diltiazem)	Imidazoline I ₂ (peripheral)	Serotonin 5-HT ₂
Calcium channel (L type, nitrendipine)	Inositol triphosphate (IP ₃)	Serotonin 5-HT ₃
Calcium channel (L type (-) D888)	Insulin	Serotonin 5-HT ₄
Calcium channel (N type)	Interferon γ	Serotonin 5-HT _{5A}
Cannabinoid CB ₁	Interleukin (IL-1α)	Serotonin 5-HT ₆
Cannabinoid CB ₂	Interleukin (IL-2)	Serotonin 5-HT ₇
Cholecystokinin (CCKA)	Interleukin (IL-6)	Serotonin transporter
Cholecystokinin (CCKB)	Interleukin (IL-8)	Sigma σ ₁
Choline transporter	CXCR1 (IL-8 _A)	Sigma σ ₂
Dopamine D ₁	CXCR2 (IL-8 _B)	Sigma (non-selective)
Dopamine D _{2L}	Leukotriene (LTB ₄)	Sodium channel (site 2)
Dopamine D _{2S}	Leukotriene (LTD ₄)	Somatostatin
Dopamine D ₃	Monoamine transporter	Testosterone
Dopamine D _{4.2}	Muscarinic M ₁	Thromboxane A ₂
Dopamine D _{4.4}	Muscarinic M ₂	Thyrotropin releasing hormone (TRH)
Dopamine D _{4.7}	Muscarinic M ₃	Transforming growth factor-β1 (TGF-β)
Dopamine D ₅	Muscarinic M ₄	Tumor necrosis factor-α (TNF-α)
Dopamine transporter	Muscarinic M ₅	Vasointestinal peptide (VIP ₁)
Endothelin ET _A	Muscarinic (non-selective)	Vasopressin V ₁
Endothelin ET _B	Muscarinic (oxotremorine-M)	

The data is cited from our previous report (*Neuropharmacology*. **48**, 301-310 (2005), Table 1).

Table 4 List of enzymes for which the inhibition by ramelteon was examined

Enzyme	Compound (μM)	Enzyme	Compound (μM)
Acetyl CoA synthetase	100	15-Lipoxygenase	30
Acetylcholinesterase	10	Monoamine oxidase A	10
Acyl CoA-cholesterol acyltransferase (hepatic)	100	Monoamine oxidase B	10
Acyl CoA-cholesterol acyltransferase (intestine)	100	Myeloperoxidase	10
Aldose reductase	100	Neutral endopeptidase	10
Angiotensin converting enzyme	10	Nitric oxide synthase, constitutive (eNOS)	10
ATPase-H ⁺ /K ⁺ (gastric)	30	Nitric oxide synthase, inducible (iNOS)	10
Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein kinase II	100	Phosphodiesterase type 1 (PDE1)	100
Calcineurin (PP2B tyrosine phosphatase)	10	Phosphodiesterase type 2 (PDE2)	100
Calpain	10	Phosphodiesterase type 3 (PDE3)	100
Carbonic anhydrase	10	Phosphodiesterase type 4 (PDE4)	100
Cathepsin G	30	Phosphodiesterase type 5 (PDE5)	100
CD45 tyrosine phosphatase	10	Phospholipase A ₂	300
Choline acetyltransferase	100	Phospholipase C	10
Collagenase IV	100	p59fyn tyrosine kinase	10
Cyclooxygenase-1	300	pS6lck tyrosine kinase	10
Cyclooxygenase-2	300	Protein kinase A, non-selective	100
EGF receptor tyrosine kinase	10	Protein kinase C, non-selective	300
Elastase	30	Protein kinase C- α	100
Free radical scavenger, SOD mimetic	10	Protein kinase C- β (I and II)	100
HER2 tyrosine kinase	10	Protein kinase C- γ	100
HMG CoA reductase	30	Protein tyrosine phosphatase 1B	10
β -Lactamase	100	Protein tyrosine phosphatase 1C	100
Leukotriene A ₄ hydrolase	100	T cell tyrosine phosphatase	10
Leukotriene C ₄ synthetase	1000	Thromboxane A ₂ synthetase	100
Lipid peroxidase	300	Tyrosine hydroxylase	10
5-Lipoxygenase	30	Xanthine oxidase	10

Effects of ramelteon on various enzyme activities were tested at concentrations shown.

Abbreviation: EGF, epidermal growth factor; HMG-CoA, 3 hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; SOD, superoxide dismutase. The data is cited from our previous report (*Neuropharmacology*, **48**, 301-310 (2005), Table 2).

サル MT₁、MT₂受容体の受容体特性ならびにラメルテオンの親和性、作動活性を測定するため、まず初めにサル MT₁、MT₂受容体のクローニングを行った結果、各ヒト型受容体に対してそれぞれ約 95、96%と高いアミノ酸レベルでの相同性を示した (*J Pharmacol Exp Ther.* **330**, 855-863 (2009), Fig. 1 および 2 参照)。2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの飽和結合試験から、サル MT₁、MT₂受容体の一過性発現細胞における K_Dはそれぞれ 19.9 ± 6.87 (MT₁)、70.4 ± 7.05 (MT₂) pM であり、各ヒト型受容体と類似した親和性を示した。この細胞膜において、ラメルテオンのサル MT₁、MT₂受容体に対する親和性はメラトニンよりそれぞれ約 5 倍、3 倍高く、ヒト型受容体に対する親和性と同等であった (Table 5)。これと一致して、サル MT₁、MT₂受容体におけるラメルテオンの作動活性もメラトニンよりそれぞれ約 10 倍、6 倍高かった。さらに、メラトニン受容体作動薬による睡眠促進作用の標的脳部位と考えられるサル SCN においても、2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの特異的結合 (K_D = 80.5 pM) が確認でき、ラメルテオンの親和性はメラトニンより約 7 倍高かった (Table 5)。

Table 5 Binding affinity (K_i) and functional potency (IC₅₀) of ramelteon and melatonin for native and recombinant monkey melatonin receptors

Compound	K _i (pM)			IC ₅₀ (pM)	
	Monkey MT ₁	Monkey MT ₂	SCN	hMT ₁	hMT ₂
Ramelteon	12.3 ± 1.00	40.4 ± 2.86	49.4 ^a	28.5 ± 8.55	20.1 ± 9.25
Melatonin	67.4 ± 24.3	129 ± 16.8	329 ^a	274 ± 40.2	111 ± 24.6

Values for recombinant receptors represent the mean ± S.E.M. of three independent experiments. ^aMonkey SCN experiments were performed once in monkey membranes from 12 monkeys because of the limited availability of tissue. The data are cited from our previous report (*J Pharmacol Exp Ther.* **330**, 855-863 (2009), Table 2).

M-II の *in vivo* における作動活性を確かめるため、ラメルテオンの顕著な睡眠促進作用が報告されているネコを用いて、脳波測定により睡眠量の変化を検討した。M-II (0.001、0.01、0.1、1 mg/kg) を経口投与後、2 時間毎の各睡眠ステージの割合を算出した (Fig. 2)。0.01 mg/kg の用量から徐波睡眠量が有意に増加し ($F_{1,7} = 10.5$, $p < 0.05$)、0.1 mg/kg 投与群では覚醒量も投与 6 時間後まで持続的に低下した (徐波睡眠、 $F_{1,7} = 121.9$, $p < 0.01$; 覚醒、 $F_{1,7} = 87.0$, $p < 0.01$)。1 mg/kg 投与群でも同様の睡眠促進作用を示した (徐波睡眠、 $F_{1,7} = 96.3$, $p < 0.01$; 覚醒、 $F_{1,7} = 56.7$, $p < 0.01$)。一方、M-II はいずれの用量においても REM 睡眠量に影響を及ぼさなかった。

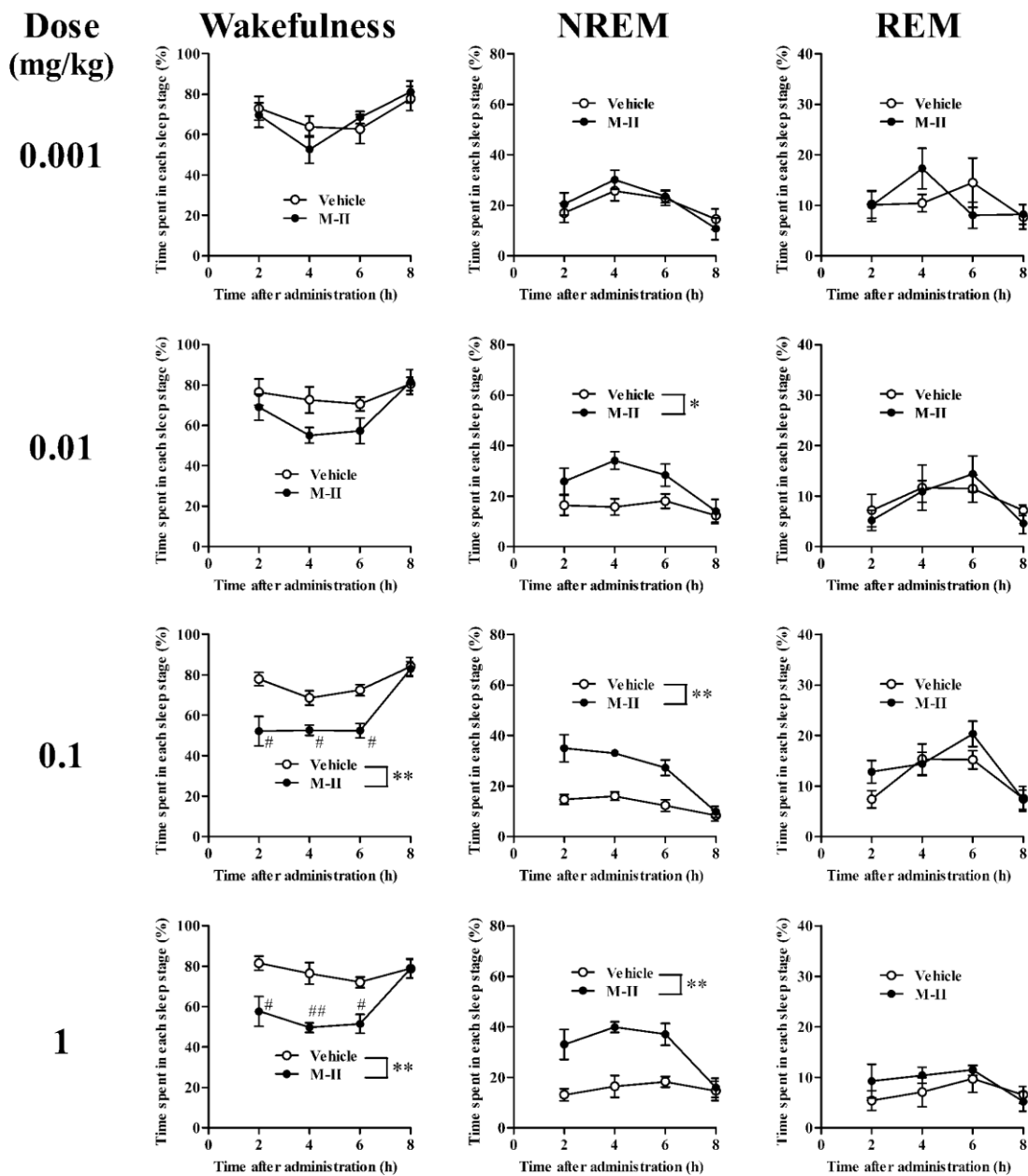


Fig. 2. Effects of M-II on sleep and wakefulness in freely moving cats

After oral administration of M-II (0.001–1 mg/kg) or vehicle to 8 cats, EEG, EOG, and EMG signals were recorded for 8 h. Data points represent the mean \pm S.E.M percentage durations of the wakefulness, NREM, or REM stage during each block of 2 h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with the vehicle-treated control (two-way ANOVA; $n = 8$). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, compared with the vehicle-treated control (paired t test with Holm correction; $n = 8$). The data is cited from our previous report (*Pharmacology*. 93, 197-201 (2014), Fig. 2).

【考察】

本章における *in vitro* の受容体結合試験、作動活性測定試験から、ラメルテオンと M-II はヒト MT₁、MT₂ 受容体に対して pM オーダーの高い親和性および作動活性を有しており、その作動活性の強さはラメルテオン > メラトニン > M-II の順であることが分かった。また、ネコ脳波測定試験において、M-II はラメルテオンと同様に徐波睡眠量を増加させ、*in vivo* においても作動活性が認められた。さらにハムスター Quinone reductase 2 ならびに各種受容体、イオンチャネルおよび酵素に対する選択性試験において、ラメルテオンと M-II はヒト MT₁、MT₂ 受容体に高い選択性を示したことから、ラメルテオンの薬効は MT₁、MT₂ 受容体を介している可能性が高い。

ラメルテオンはメラトニンより MT₁、MT₂ 受容体に対してそれぞれ約 6 倍、3 倍高い親和性をもち、cAMP 産生抑制を指標とした作動活性も約 4 倍、17 倍高かった。このラメルテオンのメラトニンより優れた親和性は、本試験と同じ 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンを使用した最近の報告と一致している [34]。ラメルテオンの K_i 値は MT₁ 受容体に対して 79 pM (本試験 14 pM)、MT₂ 受容体に対しては 50 pM (本試験 112 pM) と報告されており、やや数値が異なる点は実験条件 (アッセイバッファー組成等) の違いに起因しているかもしれない。G 蛋白質共役型受容体は G 蛋白質が受容体に結合した高親和性状態と G 蛋白質が受容体から解離した低親和性状態の二つの状態があり、MT₁、MT₂ 受容体においても各状態におけるリガンド親和性が報告されている [35]。これまでの多くの報告同様、本試験では 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの飽和曲線の解析から 1 結合部位に対する親和性算出を行っており、主に高親和性状態の受容体に対するものと考えられる。一方、上述の報告では GTP γ S と高濃度の塩化ナトリウムをアッセイバッファーに添加することにより、低親和性状態に移行させた受容体に対しても、結合試験を行っており、メラトニン、アゴメラチンなどの多くのリガンドの親和性が低下するなか、ラメルテオンはほとんど変化しなかった (MT₁, 72 pM, MT₂, 38 pM) [34]。その結果、ラメルテオンはメラトニンよりも MT₁、MT₂ 受容体に対してそれぞれ約 21 倍、30 倍高い親和性を示している。これらのことは、ラメルテオンがいずれの受容体の状態に対しても高親和性であり、メラトニンよりも高い有効性を示す可能性がある。

M-II はラメルテオンより低い親和性 (MT₁, 約 10 倍, MT₂, 約 5 倍)、作動活性 (MT₁, 約 17 倍, MT₂, 約 28 倍) を有していたが、ネコ睡眠脳波測定において 0.01 mg/kg の用量から徐波睡眠を有意に増加させた。同じ測定系においてラメルテオンの最小有効用量は 0.001 mg/kg であることが報告されている [27]。ネコにおける両薬物の血中動態は明らかになっていないが、最小有効用量の違いは作動活性の差が起因しているかもしれない。今後、経時的な各薬物の脳内濃度を調べることであれば、薬効発現に必要な受容体占有率や、薬物動態の持続性を明らかにできるであろう。

ラメルテオンと M-II はヒト MT₁、MT₂ 受容体に対して、メラトニンよりも非常に高い選択性を示した。ハムスター Quinone reductase 2 に対するラメルテオンの親和性は、メラトニンに比べて約 110 倍低く、MT₁、MT₂ 受容体に対する K_i の比 (Quinone reductase 2/MT₁, Quinone reductase 2/MT₂) で比した場合、ラメルテオンはそれぞれ約 630、380 倍高い選択性を示した (Table 1 の数値を使用して算出)。M-II については試験に使用した最高濃度 (10 μ M) まで Quinone reductase 2 に対する結合が観察されなかった。本試験ではハムスター脳由来の Quinone reductase 2 を使用し、ヒト Quinone reductase 2 での検討は行っていないため、今後ヒト型においても検討する必要がある。ただし、ヒトとハムスターとの種差については、各種間の Quinone reductase 2 に対するメラトニン

受容体作動薬の親和性に高い相関性が報告されていることから、ラメルテオン、M-II はヒト型に対してもメラトニンより低い親和性を示すと推測される [31]。メラトニンはマイクロモルオーダーの高濃度で Quinone reductase 2 の阻害活性を示すが、メラトニンのどのような生理機能に関与するかは明らかになっていない。ただし、Quinone reductase 2 の阻害は活性酸素種を減少させることから、メラトニンの細胞保護作用への関与が示唆されており、今後 Quinone reductase 2 KO マウス等を用いてその寄与が検証されるであろう [32]。ラメルテオンとメラトニンとの作用の違いに関して、ジアゼパム誘発ラット運動機能試験において報告されており、Quinone reductase 2 に対して親和性を示すメラトニンやN-アセチルセロトニンがジアゼパムによる運動機能障害を悪化させるのに対し、ラメルテオンは影響を及ぼさなかった [36]。このような運動機能障害に対する異なる作用は Quinone reductase 2 に対する作用の違いが関与しているかもしれない。また、ヒトにおいてメラトニンと GABA_A 作動薬との併用時にこのような運動機能障害をもたらすかどうか注目しておく必要がある。

サル MT₁、MT₂ 受容体に対するラメルテオンおよびメラトニンの親和性はヒト型受容体に対する親和性と類似しており、メラトニンよりもそれぞれ約 5 倍、3 倍高かった (Table 5)。これはサル MT₁、MT₂ 受容体のアミノ酸配列の相同性がヒト型に対してそれぞれ約 95%、96% と非常に高いためと考えられる。ラットとヒトメラトニン受容体間の相同性はより低く、MT₁ 受容体が約 84%、MT₂ 受容体が約 80% であり、次の章で示すように、INS-1 細胞膜のラット MT₁ 受容体に対するラメルテオンの親和性はメラトニンとほぼ同等であった。また、MT₂ 受容体選択的拮抗薬として様々な試験に使用されている 4P-PDOT の MT₂ 受容体に対する親和性は、ヒトとラット間で約 90 倍の差 (K_i, human, 0.46 nM; rat, 36.2 nM) が報告されており、ラットでは MT₂ 受容体選択性が低い [30]。このような親和性の種差は *in vivo* における薬効の理解に大きな影響を与えるため、検討しておくべきであろう。メラトニン受容体作動薬の標的脳部位であるサル SCN において、2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの特異的な結合が認められ、その親和性 (K_D, 80.5 pM) はヒト (K_D, 53.3 pM) やラット (K_D, 52.8 pM) と同等であった [37, 38]。この組織において、ラメルテオンはメラトニンよりも約 7 倍高い親和性を示した。これらの結果はメラトニン受容体作動薬の睡眠評価においてサルを用いる妥当性を支持している。

以上より、ラメルテオンと M-II は MT₁/MT₂ 受容体選択的作動薬であり、M-II はより低活性ではあるが、メラトニン受容体作動薬としてラメルテオンの薬効に一部寄与している可能性が示された。

第2章 細胞レベルにおけるラメルテオンおよびM-IIの作用持続性

【緒言】

G 蛋白質共役型受容体の作動薬や拮抗薬は、その作用持続時間によって分類されている。例えば、臨床で用いられている $\beta 2$ アドレナリン受容体作動薬の場合、1日複数回の投与を必要とする短時間作用型のsalbutamolや1日1回投与の長時間作用型のindacaterolなどがある [39, 40]。また、これまでの多くの報告から、*in vivo*における薬剤の作用持続時間は、薬物動態だけでなく、薬物と標的分子との相互作用様式にも依存することが示唆されている。 $\beta 2$ アドレナリン受容体作動薬の場合、そのような因子としてリガンドの脂溶性、受容体からの解離速度、受容体への再結合 (rebinding)、受容体の非活性部位への結合 (exosite binding) などが挙げられている [41-44]。その他の例として、NK1受容体 (tachykinin receptor 1) やCRF1受容体 (corticotropin-releasing hormone receptor 1) の拮抗薬では、受容体からの解離速度が*in vivo*における薬効の作用持続時間に寄与していた [45, 46]。メラトニン受容体作動薬についても、その作用持続時間や関与する因子を明らかにすることは薬効を理解する上で重要である。また、作用持続時間は作動薬による受容体脱感作によっても影響を受ける可能性がある。

メラトニンによるメラトニン受容体の脱感作の研究は*in vitro*および*in vivo*において複数報告されている。ヒトMT₁およびMT₂受容体発現CHO細胞において、メラトニンはMT₁受容体に比べ、MT₂受容体をより顕著に脱感作させた [47]。夜間における生理的濃度 (300–400 pM) のメラトニンを8時間暴露した場合、MT₁受容体の数や作動活性は変化しないのに対し、MT₂受容体数は受容体の内在化を伴って約1/3程度まで減少した。また、このようなメラトニンによるMT₂受容体の著しい脱感作は内在性MT₂受容体を発現するSCN2.2細胞においても認められている [48]。また、*in vivo*における脱感作試験として、MT₂受容体は欠損し、MT₁受容体のみ有するシリアンハムスターへメラトニンを14日間慢性投与 (1 mg/kg, s.c.) した際、SCNにおけるメラトニンの神経発火抑制作用は変化しなかった [49]。これら*in vitro*および*in vivo*の報告から、メラトニンによるMT₁受容体の脱感作は、MT₂受容体と比べて非常に生じにくいことが示唆されている。また、これまでにメラトニンの作用持続性に関する知見がいくつか報告されているが、メラトニン受容体作動薬間の違いやそれに関与する因子は明らかになっていない [48, 50-52]。

上述したようにMT₂受容体の脱感作はMT₁受容体に比べて顕著に生じることから、本章ではMT₁受容体におけるメラトニン受容体作動薬 (ラメルテオン、M-II、メラトニン、2-ヨードメラトニン) の作用持続性を比較検討した。各作動薬をヒトMT₁発現CHO細胞へ2時間処置した後、細胞を洗浄し、その後の残存する作動活性をcAMP産生抑制量およびリン酸化ERK増加量を指標として経時的に測定した。また、作用持続性の違いに関与する因子を見出すため、作動薬による脱感作、作動薬の脂溶性および受容体からの解離速度を検討した。同様に、内在性MT₁受容体を発現するラット膵 β 細胞株INS-1を用いて、作動薬間の作用持続性の違いを検討した。

【方法】

1. 試薬

使用した 7 種のメラトニン受容体作動薬の化学構造を下記に示す。武田薬品工業株式会社 (Osaka, Japan) にて合成された 5 種のメラトニン受容体作動薬は以下の通りである。ラメルテオン ((S)-N-[2-(1,6,7,8-tetrahydro-2H-indeno-[5,4-b]furan-8-yl)ethyl]propionamide), M-II ((2S)-2-hydroxy-N-[2-[(8S)-1,6,7,8-tetrahydro-2H-indeno[5,4-b]furan-8-yl]ethyl]propionamide), compound 1 ((1R,2R)-N-{[2-(2-methyl-2H-indazol-4-yl)cyclopropyl]methyl}propanamide) [WO Patent WO2008136382], compound 2 ((1R,2R)-N-{[2-(2-methylpyrazolo[1,5-a]pyridin-4-yl)cyclopropyl]methyl}cyclopropanecarboxamide) [WO Patent WO2008136382], and compound 3 ((S)-N-[2-(2-methyl-2,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[e]indazol-8-yl)ethyl]acetamide) [WO Patent WO2008084717]. メラトニン、百日咳毒素 (PTX)、3-イソブチル-1-メチルキサンチンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。2-ヨードメラトニン、ルジンドールは Tocris Cookson Ltd. (Bristol, UK) から、2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンは PerkinElmer Inc. (Waltham, MA, USA) から、Anti-ERK 1/2 (#9107)、Anti-phospho-ERK 1/2 (#9101)、Anti-CREB (#9104)、Anti-phospho-CREB antibodies (#9198) は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) から入手した。IRDye800CW-conjugated anti-rabbit IgG は Rockland Immunochemicals Inc. (Gilbertsville, PA, USA) から購入した。その他全ての試薬は Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) から購入した。

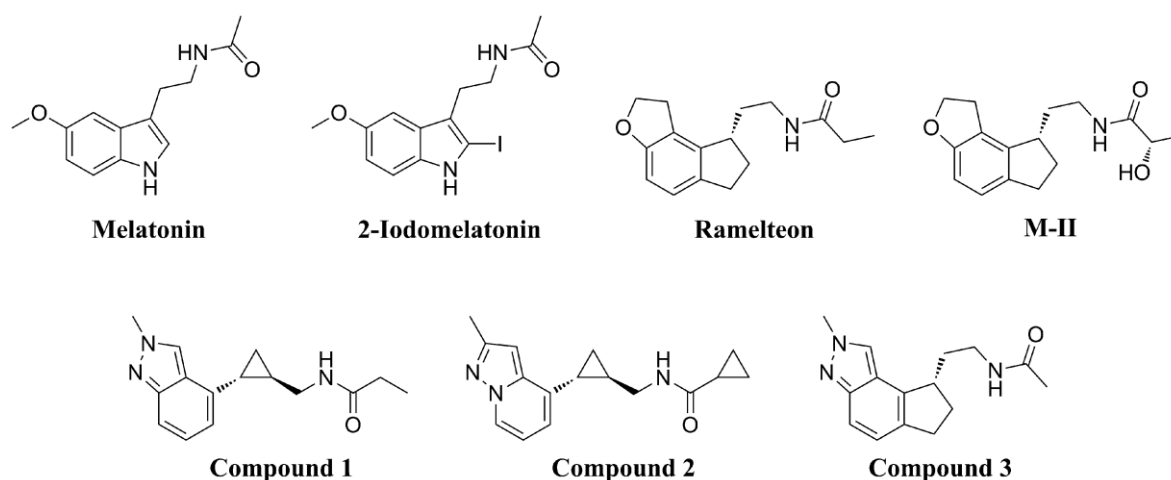


Fig. 3. Chemical structures of the tested melatonin agonists

2. 細胞培養

ヒト MT₁ 発現 CHO 細胞株 (CHO-hMT₁) は第一章で作成したものを使用し、10% 透析済みウシ胎児血清、100 units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む MEM-α 培地を用いて 5% CO₂ 気層下にて培養した。INS-1 832/13 細胞 (INS-1) は INS-1 ラットインスリノーマ由来の細胞株であり、Christopher B. Newgard 博士 (Duke University Medical Center, Durham, NC, USA) から

供与していただいた。1 mM ピルビン酸ナトリウム、10 mM HEPES、10% ウシ胎児血清、55 μ M 2-メルカプトエタノール、100 units/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地を用いて 5% CO₂ 気層下にて培養した。

3. CHO-hMT₁ 細胞および INS-1 細胞の細胞膜調製

培養した CHO-hMT₁ 細胞および INS-1 細胞を PBS にて洗浄後、1 mM EDTA 含有 PBS により細胞を剥がした。遠心して (1000 \times g, 5 分) 細胞を回収してから、氷冷した 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5–7.7) で懸濁し、使用時まで -80°C にて保存した。細胞膜はトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5–7.7) 中での細胞のホモジナイズおよび遠心 (40,000 \times g, 20 分, 4°C) を繰り返すことにより取得した。蛋白質濃度は Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit を用いて測定した。

4. 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの結合、解離速度の測定

アッセイバッファーとして 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.7) を用いて、CHO-hMT₁ 細胞膜 (約 30 μ g/tube)、10 μ M メラトニンもしくは溶媒 (ジメチルスルホキシド) を調製し、試験管に加え、2つの異なる濃度の 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニン (50 および 200 pM) をそれぞれ添加することで反応を開始した。37°C 下 5、10、20、40、80 もしくは 160 分間反応させた後、氷冷したアッセイバッファーを加えてワットマン GF/B フィルターへ吸引濾過し、反応を停止させた。その後、素早く 3 mL のアッセイバッファーで 3 回フィルターを洗浄して、放射活性を γ カウンターにより測定した。非特異的結合の検出には 10 μ M のメラトニンを添加した。

5. 非ラベル化メラトニン受容体作動薬の解離速度測定

50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.7) にて希釈した CHO-hMT₁ 細胞膜へ、10 nM の各メラトニン受容体作動薬 (メラトニン、2-ヨードメラトニン、ラメルテオン、M-II、compound 1、compound 2、もしくは compound 3) を加えて 25°C 下 90 分間反応させた。非結合リガンドを除くため、50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.7) を加えて遠心 (40,000 \times g, 20 分, 4°C) し、細胞膜を 3 回洗浄した。リガンドが受容体から解離するのを防ぐため、すべての工程を 4°C 下で行った。50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.7) を用いて細胞膜を再懸濁後、蛋白質濃度を Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit により測定した。50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.7) を用いて、CHO-hMT₁ 細胞膜 (約 30 μ g/tube)、10 μ M メラトニンもしくは溶媒 (ジメチルスルホキシド) を調製し、試験管に加え、200 pM 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンを添加することで反応を開始した。37°C 下 5、10、20、40、80 もしくは 160 分間反応させた後、上記同様に吸引濾過および洗浄を行い、放射活性を測定した。

6. INS-1 細胞膜におけるメラトニン受容体作動薬の親和性測定

INS-1 細胞膜における 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの K_D および最大受容体密度 (B_{max}) を測定するため、アッセイバッファーとして 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.7) を用いて、INS-1 細胞膜 (約 12–30 μ g/tube)、10 μ M メラトニンもしくは溶媒 (ジメチルスルホキシド) を調製し、試験管に加え、各濃度の 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニン (6.25–400 nM) を添加してから 25°C 下 90 分間反応させた。各メラトニン受容体作動薬の K_i は競合結合によって算出するため、50 mM トリス塩酸緩

衝液 (pH 7.7) で希釈した INS-1 細胞膜 (約 15 µg/tube) に、メラトニン、ラメルテオン、2-ヨードメラトニン (それぞれ 0.64 pM–10 nM) もしくは M-II (3.2 pM–50 nM) を加えた後、50 pM 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンを加えて、25°C 下 90 分間反応させた。その後、上記同様に吸引濾過および洗浄を行い、放射活性を測定した。

7. cAMP 試験

10%透析済みウシ胎児血清を含む MEM- α 培地を用いて、CHO-hMT₁ 細胞を 96 ウェルプレート (10⁵ 細胞/cm²) に播種して 2 日間培養した。その後、血清入り培地を除き、アッセイバッファー (10 mM HEPES を含むハンクス緩衝液) で希釈した溶媒 (ジメチルスルホキシド) もしくはメラトニン受容体作動薬 (メラトニン、2-ヨードメラトニン、ラメルテオン、M-II、compound 1、compound 2、もしくは compound 3) を加えて 2 時間培養した。PTX を使用した試験では、作動薬添加の前日から 24 時間 PTX (100 ng/mL) を前処置した。メラトニン受容体拮抗薬ルジンドールを使用した試験では、メラトニン受容体作動薬とともにルジンドール (10 µM) を同時に処置した。2 時間培養後、アッセイバッファーで細胞を 2 回洗浄し、経時変化試験においては無血清培地を用いてさらに 1.5、3、6、もしくは 24 時間培養した。脱感作試験では、フォルスコリン刺激前に再度、溶媒 (ジメチルスルホキシド)、メラトニン (0.003–3 nM)、2-ヨードメラトニン (0.001–1 nM)、ラメルテオン (0.001–1 nM) もしくは M-II (0.01–10 nM) を 5 分間前処置した。続いて 100 µM 3-イソブチル-1-メチルキサンチンを含むアッセイバッファー中において、10 µM フォルスコリン刺激を 37°C 下 15 分間行った。

8. リン酸化 ERK 測定試験

CHO-hMT₁ 細胞の培養およびメラトニン受容体作動薬の刺激は cAMP 試験と同様に行い、各時間 (10、30、60、もしくは 120 分) 反応させた。メラトニン受容体作動薬の作用持続性試験では、作動薬の添加後に細胞の洗浄および 90 分間の追加培養を行った。その後、4% パラホルムアルデヒドにて細胞を室温下 20 分間固定し、PBS で繰り返し洗浄した。10% ウシ胎児血清、0.15% TritonX-100 を含む PBS を用いて、一次抗体 anti-phospho-ERK 1/2 (希釈率 1:1000) および anti-total ERK 1/2 (希釈率 1:1000) を希釈し、細胞に添加して 4 °C 下一晩反応させた。PBS にて 3 回洗浄後、二次抗体 Alexa Fluor 680-conjugated anti-mouse IgG (希釈率 1:200) および IRDye800CW-conjugated anti-rabbit IgG (希釈率 1:800) を細胞に添加して室温下 1 時間反応させた。PBS にて 4 回洗浄後、各ウェルの蛍光を Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) にて計測した。

9. リン酸化 CREB 測定試験

INS-1 細胞をポリエルリジンコートした 96 ウェルプレート (4.7 × 10⁴ 細胞/cm²) に播種して 1.5–2 日間培養した。各メラトニン受容体作動薬の作動活性を比べるため、0.2% BSA を含む Krebs-Ringer bicarbonate HEPES バッファー (アッセイバッファー) 中において、メラトニン、ラメルテオン、2-ヨードメラトニン、M-II、もしくは溶媒 (ジメチルスルホキシド) を細胞に 10 分間前処置してから、1 µM フォルスコリンで 30 分間刺激した。メラトニン受容体作動薬の残存活

性を測定する際には、RPMI1640 培地中にて 2-ヨードメラトニン、M-II、もしくは溶媒（ジメチルスルホキシド）を細胞へ添加し、2 時間後にアッセイバッファーを用いて 2 回細胞を洗浄した。その後、直ちに 0.1 μM フォルスコリンを添加し、30 分間刺激した。細胞固定および細胞免疫染色は上記のリン酸化 ERK 測定試験と同様に行った。ただし、1 次抗体は anti-phospho-CREB antibody (1:100) および mouse anti-total-CREB antibody (1:300) を使用した。

10. データ解析

結果は平均値 \pm 標準誤差で表した。 K_D 、 EC_{50} 、 IC_{50} 値は GraphPad PRISM software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いた非線形ロジスティック回帰分析により算出した。 K_i は Cheng と Prusoff の式に従い、 IC_{50} 、 K_D 、使用ラベル体濃度から算出した。2-[^{125}I]ヨードメラトニンの結合、解離速度は、以下の結合速度モデルに従い、2 種の濃度の 2-[^{125}I]ヨードメラトニンを用いた結合速度試験結果から算出した。

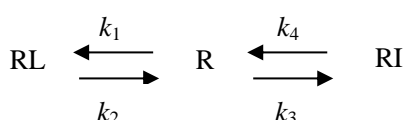
$$k_{ob} = [L] k_1 + k_2$$

$$Y_{max} = B_{max} \times ([L]/(K_D + [L]))$$

$$Y = Y_{max} (1 - \exp^{-k_{ob} \times t})$$

k_1 = 結合速度定数、 k_2 = 解離速度定数、 k_{ob} = 見かけの速度定数、 K_D = 平衡解離定数、 $[L]$ = 2-[^{125}I]ヨードメラトニン濃度 (nM)、 t = 反応時間 (min)、 Y = ある反応時間における 2-[^{125}I]ヨードメラトニンの特異的結合量 (fmol/mg protein)、 B_{max} = 平衡時の 2-[^{125}I]ヨードメラトニンの最大結合量 (fmol/mg protein)

2-[^{125}I]ヨードメラトニンの結合速度試験で算出された k_1 、 k_2 を確かめるため、 $K_D = k_2/k_1$ の式を用いて K_D を算出し、第一章の飽和曲線から算出されている K_D と比較した。非放射ラベル化合物の解離速度を算出するため、Malany らによって開発された下記式を用いた [53]。この式において、放射性ラベル体 (L) もしくは非放射ラベル化合物 (I) と受容体 (R) との相互作用は 2 分子間かつ可逆的と定義される。



受容体から解離した非放射ラベル化合物は、その濃度が極めて低いため、ほとんど受容体に再結合しないと考えられている。そのため、以下の式には k_3 を含まない。

$$d[R]/dt = [RI] k_4 + [RL] k_2 - [R] [L] k_1$$

$$-d[RI]/dt = [RI] k_4$$

$$d[RL]/dt = [R] [L] k_1 - [RL] k_2$$

$$d[L]/dt = [RL] k_2 - [R] [L] k_1 \approx 0$$

$$B_{max} = [R] + [RL] + [RI]$$

これらの数式から下記の式 (1) が算出される。

$$[RL] = k_1 [L] B_{max} (1 - e^{-(k_1[L] + k_2)t}) / (k_1 [L] + k_2) + k_1 [L] [RI]_{t=0} (e^{-(k_1[L] + k_2)t} - e^{-k_4 t}) / (k_1 [L] + k_2 - k_4) \quad (1)$$

$[RI]_{t=0}$ = 放射ラベル体添加開始時における非放射ラベル化合物の受容体結合量、 $[RL]$ = ある反応時間における 2-[^{125}I]ヨードメラトニンの特異的結合量 (fmol/mg protein)、 $[L]$ 、 t 、 B_{max} は上記に

記載した定義と同じである。 k_4 は2- ^{125}I ヨードメラトニンの結合速度試験から算出された k_1 および k_2 を用いて計算した。統計解析は SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた t 検定、ウイリアムズ検定もしくはダンネット検定により行った。有意水準を $P < 0.05$ (t 検定、ダンネット検定)、 $P < 0.025$ (ウイリアムズ検定) とした。

【結果】

メラトニン受容体作動薬の作用持続時間を比較するため、ラメルテオン、M-II、メラトニンおよび2-ヨードメラトニンを用いた (Fig. 3)。各薬剤のヒト MT_1 受容体における作動活性 (IC_{50}) は第一章 (Table 1、2) において算出しており、下記の通りである。ただし、メラトニンとラメルテオンは独立した2回の試験を実施しているため、2つの値を記載する。メラトニン (77.8、48.1 pM)、2-ヨードメラトニン (26.8 pM)、ラメルテオン (21.2、12.4 pM)、M-II (208 pM)。

一部の β_2 アドレナリン受容体作動薬は β_2 アドレナリン受容体 (Gs 共役型) を発現させた CHO 細胞や単離組織において、薬剤洗浄後も持続的な活性を示す [54, 55]。同様に、メラトニン受容体作動薬の作用持続性を検討するため、CHO-h MT_1 細胞において薬剤洗浄後の作動活性を測定した。メラトニン受容体作動薬を2時間処置した後、2回アッセイバッファーにて洗浄し、フォルスコリン刺激による cAMP 産生量を測定した。興味深いことに、薬剤洗浄直後にフォルスコリン刺激した場合、cAMP 産生増強もしくは抑制といった作動薬間で異なる2種類の反応が観察された (Fig. 4A)。この cAMP 産生増強作用は sensitization と呼ばれ、アデニルシクラーゼ経路の細胞特異的な代償反応と考えられている [56]。メラトニンによる sensitization はこれまでに報告されており、本試験においても、メラトニンおよび M-II は sensitization を引き起こした [57]。ただし、その用量反応曲線は異なり、メラトニンが逆 U 字型であったのに対し、M-II は用量依存的であった。一方、ラメルテオンと2-ヨードメラトニンは薬剤除去後も、前処置濃度に依存して cAMP 産生を持続的に抑制した。これらの結果は、各薬物の作動活性が同等になる濃度を用いた場合でも、薬剤間で残存活性が異なることを示唆している。

薬剤除去後の作用持続性をさらに調べるため、各作動薬 (1 nM) を2時間前処置および除去後、最大24時間後まで培養し、各時点におけるフォルスコリン誘発 cAMP 産生量を検討した (Fig. 4B)。ラメルテオンと2-ヨードメラトニンは、少なくとも薬剤除去3時間後まで cAMP 産生を抑制した。その後、徐々にその抑制活性は消失し、24時間後には弱い sensitization が生じた。メラトニンおよび M-II による sensitization は約3時間観察された後、消失した。

これらの薬剤除去後の反応が MT_1 受容体を介しているかどうか調べるため、Gi 蛋白質阻害剤 PTX と MT_1/MT_2 受容体拮抗薬ルジンドールを用いて、ラメルテオンによる残存活性および M-II による sensitization に対する作用を検討した (Fig. 4C、D)。PTX およびルジンドールの前処置は、ラメルテオンによる残存活性や M-II の sensitization を完全に消失させた。以上から、メラトニン受容体作動薬の異なる残存活性は MT_1 受容体を介した作用であり、残存活性の有無は MT_1 受容体の活性化の程度では説明できないことが分かった。

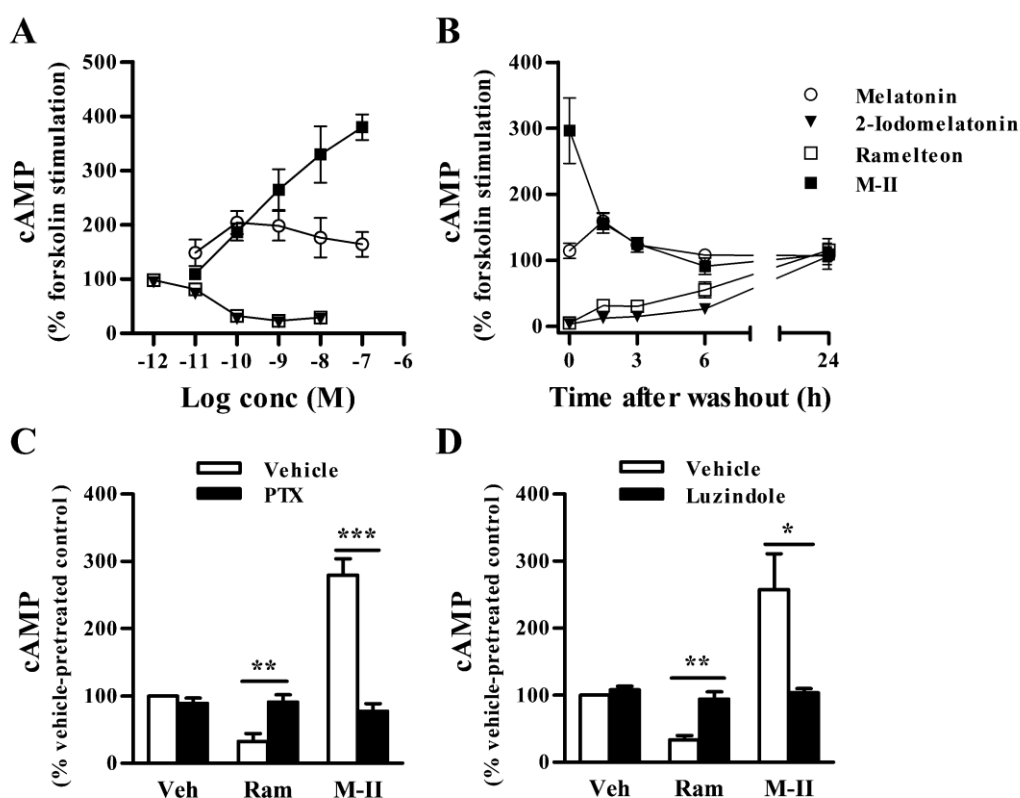


Fig. 4. Differential cAMP responses of CHO-hMT₁ cells to forskolin stimulation after pretreatment with melatonin agonists followed by withdrawal

(A) Dose-dependent inhibition or enhancement of melatonin agonists on forskolin-stimulated cAMP formation. (B) Time-course of forskolin-stimulated cAMP responses after agonist withdrawal. (C and D) Reversal of the actions of ramelteon and M-II on forskolin-stimulated cAMP formation by PTX (100 ng/mL) and luzindole (10 μ M). CHO-hMT₁ cells were exposed to melatonin agonists (A, 1 pM-0.1 μ M; B, C, and D, 1 nM) for 2 h. Following repeated washing, forskolin-stimulated cAMP formation was measured at each time point (A, C, and D, 0 h; B, 0, 1.5, 3, 6, and 24 h). Values are expressed as percentages of 10 μ M forskolin-stimulated cAMP formation in vehicle-pretreated controls. Data are presented as the mean \pm S.E.M. of 3 or 4 separate experiments performed in quadruplicate. Data were analyzed using t-test; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. vehicle. The data is cited from our previous report (*Eur J Pharmacol.* **757**, 42-52 (2015), Fig. 2).

cAMP 試験におけるメラトニン受容体作動薬の作用持続性の違いを確かめるため、リン酸化 ERK レベルを指標として同様の試験を行った。まず CHO-hMT₁ 細胞において、リン酸化 ERK レベルを指標とした各作動薬の作動活性を測定した。すべての作動薬は濃度依存的にリン酸化 ERK を増加させ (Fig. 5A)、作動活性 (EC₅₀) は cAMP を指標とした場合とおおよそ相関した (メラトニン、35.6 \pm 9.4 pM、2-ヨードメラトニン、15.2 \pm 2.1 pM、ラメルテオン、17.9 \pm 1.4 pM、M-II、89.3 \pm 14.2 pM)。また、ラメルテオン (1 nM) および M-II (3 nM) によるリン酸化 ERK の増加

はルジンドールによって消失した (Fig. 5B)。各作動薬は添加 10 分後に著しくリン酸化 ERK を増加 (400%以上) させたが、添加 2 時間後にはそのリン酸化レベルが約 200%まで低下した (Fig. 5C)。さらに薬剤除去および洗浄を行い、3 時間培養するとリン酸化 ERK の増加は検出できなかった。そのため、各作動薬の残存活性の用量反応性試験は、各作動薬を 2 時間処置後、薬剤除去および洗浄し、さらに 1.5 時間培養してからリン酸化 ERK を測定した。ラメルテオン、2-ヨードメラトニン処置群はメラトニン、M-II 処置群に比べ、薬剤除去後もリン酸化 ERK のレベルが高かった (Fig. 5D)。また、M-II は最も高いリン酸化 ERK の増加を引き起こす濃度においても、残存活性は全く認められなかった。以上の cAMP とリン酸化 ERK の試験結果から、ラメルテオンと 2-ヨードメラトニンは、メラトニン、M-II よりも顕著な作用持続性をもつことが示された。

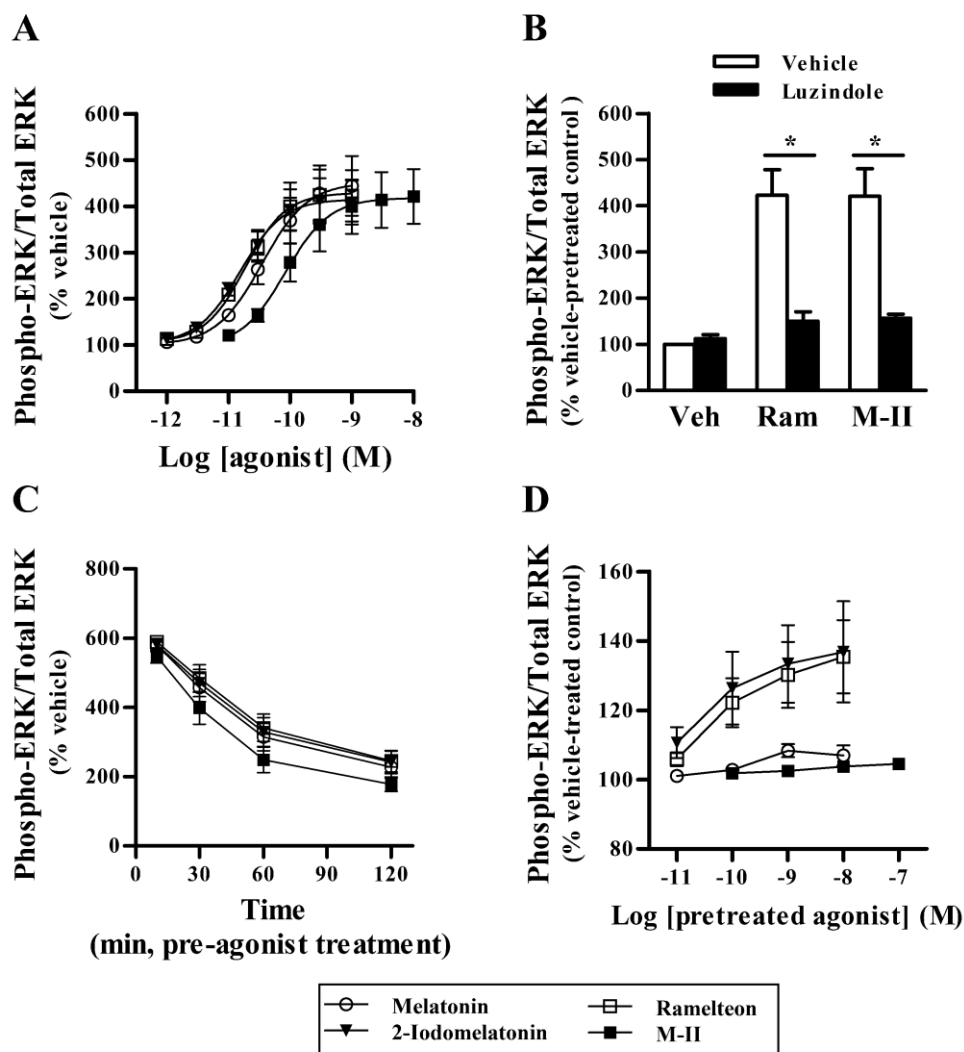


Fig. 5. Prolonged phosphorylation of ERK following withdrawal of melatonin agonists in CHO-hMT1 cells

(A) Concentration-dependent ERK phosphorylation induced by a short treatment of melatonin agonists. (B) Antagonistic action of luzindole (10 μ M) on ERK phosphorylation stimulated by ramelteon and M-II. (C) Time-dependent decrease in ERK phosphorylation during agonist treatments. (D) Concentration-dependent

ERK phosphorylation at 1.5 h following agonist washout. CHO-hMT₁ cells were incubated with melatonin agonists (A, 1 pM-10 nM; B, 1 nM ramelteon, 3 nM M-II; C, 1 nM; D, 10 pM-100 nM) for each period (A and B, 10 min; C, 10, 30, 60, 120 min; D, 120 min). ERK phosphorylation was measured after the agonist treatment period (A, B, and C) or at 1.5 h after agonist withdrawal (D). Values are expressed as percentages of the ratio of phosphorylated ERK to total ERK in the vehicle-pretreated group (100%). Data are presented as the mean ± S.E.M. of 3 separate experiments performed in triplicate. Data were analyzed using t-test; *P < 0.05 vs. vehicle. The data is cited from our previous report (*Eur J Pharmacol.* **757**, 42-52 (2015), Fig. 3).

MT₁ 受容体シグナルの作用持続性に関与する候補因子のひとつとして、まずメラトニン受容体作動薬の受容体からの解離速度について着目した。非放射ラベル化合物のヒト MT₁ 受容体からの解離速度を測定するため、遅延性放射リガンド結合法 (delayed radioligand association approach) を用いた。本方法は、先に受容体に結合させた非放射ラベル化合物の解離速度に依存して、後から添加した放射ラベル化合物の結合が遅れることに基づいている。また、2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの k_{on} (k_1)、 k_{off} (k_2) を算出するため、2種の濃度の 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニン (50、200 pM) を用いた結合速度試験を行った。さらに非放射ラベル化合物の k_{off} (k_4) は、これら k_1 、 k_2 および前述の数式 (【方法】10 の式 (1)) を用いて計算した。2種の濃度の 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの受容体結合が平衡に達するまで測定し、結合速度モデル (association kinetic model) を使用した結果、 k_{on} (k_1) は $1.10 \pm 0.11 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 、 k_{off} (k_2) は $0.0134 \pm 0.0023 \text{ min}^{-1}$ 、さらに B_{max} は $96.3 \pm 10.9 \text{ fmol/mg protein}$ であることが分かった (Fig. 6A)。これら結合、解離速度から算出された K_D ($12.7 \pm 2.5 \text{ pM}$) は、第一章の 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの飽和結合曲線から求められた K_D ($15.0 \pm 3.0 \text{ pM}$) とほぼ一致した。遅延性放射リガンド結合試験は以下のように行い、各作動薬の k_{off} (k_4) を算出した (Fig. 6B)。先にヒト MT₁ 受容体を非放射ラベルの作動薬で完全に占有するため、高濃度 (10 nM) の各作動薬を CHO-hMT₁ 細胞膜に加えて反応させた。その後、受容体に結合していない作動薬を洗って除き、2-[¹²⁵I]ヨードメラトニン (200 pM) を添加した。非放射ラベルの作動薬が受容体から解離することにより、2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンは占有されていない受容体へ結合することができるため、あらかじめ作動薬によって受容体が占有されていると、2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの受容体結合速度は遅くなる。この結果、作動薬の解離速度の大きさの順は、M-II > メラトニン > ラメルテオン = 2-ヨードメラトニンであった (Table 6)。また、2-ヨードメラトニンの解離速度 ($0.0119 \pm 0.0026 \text{ min}^{-1}$) は、前述の結合速度試験で算出された 2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの解離速度 ($0.0134 \pm 0.0023 \text{ min}^{-1}$) と良く一致していた。

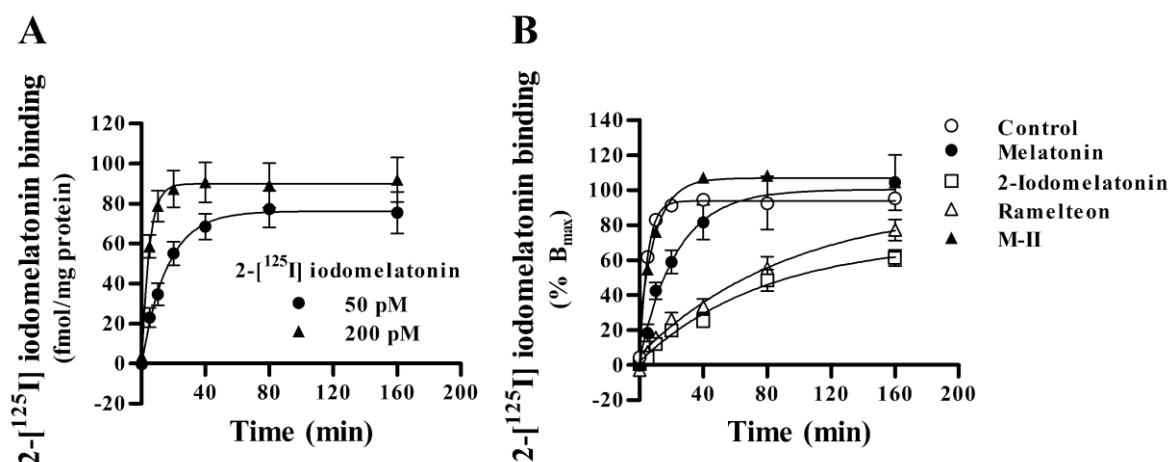


Fig. 6. Time-courses of associations of 2-[¹²⁵I] iodomelatonin with the human MT₁ receptor
 (A) CHO-hMT₁ membranes were incubated for up to 160 min with 2-[¹²⁵I] iodomelatonin (50 and 200 pM).
 (B) CHO-hMT₁ membranes were preincubated with each unlabeled agonist (10 nM) and then washed prior to the addition of 2-[¹²⁵I] iodomelatonin (200 pM). 2-[¹²⁵I] iodomelatonin binding to membranes were assessed for up to 160 min. Data are presented as the mean ± S.E.M. of 3-6 separate experiments performed in duplicate. The parameters determined from these curves are summarized in Table 6. The data is cited from our previous report (*Eur J Pharmacol.* **757**, 42-52 (2015), Fig. 4).

Table 6. Dissociation rate constants (k_{off}) and half-lives ($t_{1/2}$) of melatonin agonists for human MT₁ receptor

Compound	k_{off} (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
Melatonin	0.0447 ± 0.0071	16.5 ± 3.0
2-Iodomelatonin	0.0119 ± 0.0026	69.3 ± 13.9
Ramelteon	0.0104 ± 0.0016	69.8 ± 10.0
M-II	0.098 ± 0.0096	7.25 ± 0.77

Data are presented as the mean ± S.E.M. of 3-6 separate experiments. The data is cited from our previous report (*Eur J Pharmacol.* **757**, 42-52 (2015), Table 1).

メラトニン受容体作動薬の作用持続性と受容体解離速度との関係を明らかにするため、解離速度と cAMP 試験（薬剤除去直後のフォルスコリン刺激による cAMP 産生量、Fig. 4A）、もしくはリン酸化 ERK 試験（薬剤除去 1.5 時間後のリン酸化 ERK レベル、Fig. 5D）における残存活性との相関性を調べた。このような相関解析を行うため、これまでに用いた 4 つの作動薬に加えて、新たに 3 つの作動薬（compound 1、compound 2、compound 3、Fig. 3 参照）のデータを追加取得した。合計 7 つの作動薬の解離速度は cAMP 試験（Fig. 7A、 $r^2 = 0.94$ 、 $P < 0.01$ ）およびリン酸化 ERK 試験（Fig. 7B、 $r^2 = -0.92$ 、 $P < 0.01$ ）における残存活性と有意に相関した。一方、 β_2 アドレナ

リン受容体作動薬の報告とは異なり、作動薬の脂溶性 ($\text{LogD}_{7.4}$) と残存活性は相関しなかった (Fig. 7C、 $r^2 = -0.02$ 、Fig. 7D、 $r^2 = 0.36$)。

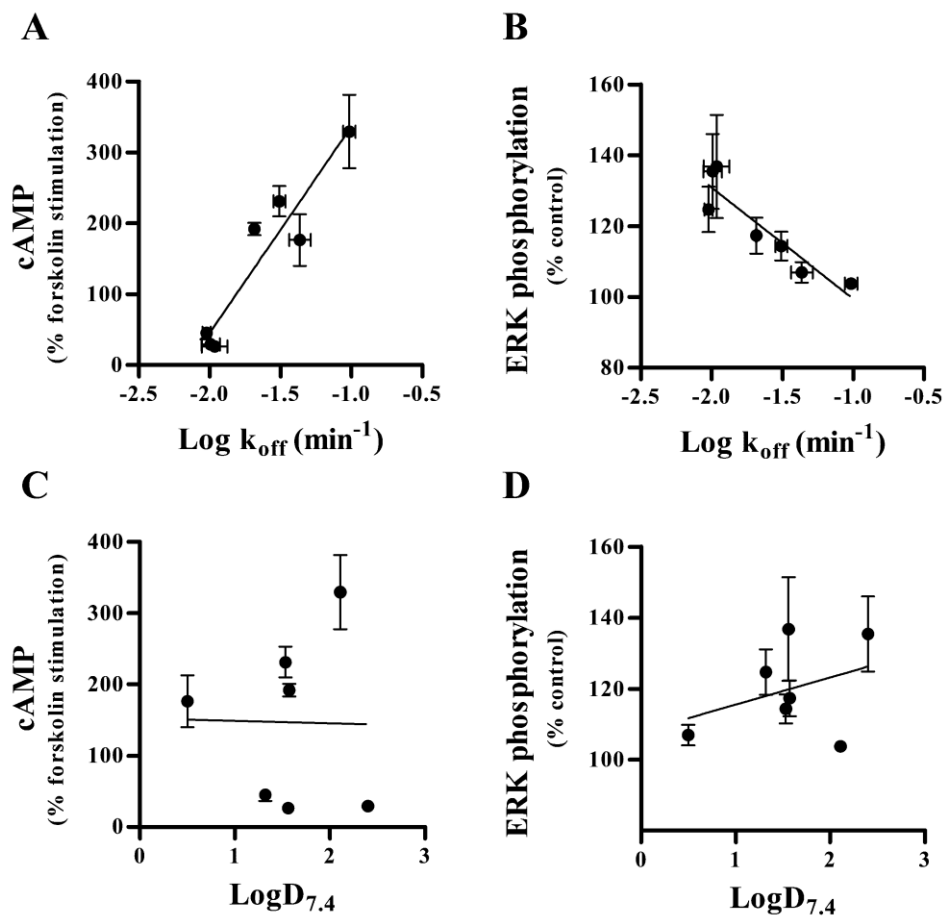


Fig. 7. Correlation of residual agonist activities with log koff and logD7.4 values

Residual activities of 7 melatonin agonists were assessed using cAMP assays (A and C, as described in Fig. 4A) and ERK assays (B and D, as described in Fig. 5D). Plots were generated using data from 10 nM agonist treatments. Each plot represents the mean \pm S.E.M. of 3-6 separate experiments, except for measured $\text{logD}_{7.4}$ value, which was obtained in a single experiment. The data is cited from our previous report (*Eur J Pharmacol.* **757**, 42-52 (2015), Fig. 5).

次に受容体脱感作の残存活性に与える影響を調べるため、フォルスコリン誘発 cAMP 産生抑制活性を指標として、作動薬前処置による用量反応曲線の変化を検討した。作動薬を CHO-hMT₁ 細胞に 2 時間処置した後、細胞を 2 回洗浄してから各濃度の作動薬を再度添加し、フォルスコリン誘発 cAMP 産生に対する抑制活性を測定した。残存活性に与える受容体脱感作の影響を十分考慮するため、前述の cAMP 試験 (Fig. 4A) における各薬剤の最大濃度を用いた (ラメルテオン、2-ヨードメラトニンは 10 nM、メラトニン、M-II は 100 nM)。4 つの作動薬の用量反応曲線はすべて右方シフトし、作動活性は約 2-4 倍減少した (Fig. 8、Table 7)。ただし、ラメルテオン、2-ヨードメラトニンは高い残存活性を有するにもかかわらず、それらの脱感作の程度はメラトニンや

M-II よりも大きかった。これらの結果から、メラトニン受容体作動薬の受容体解離速度がその作用持続性に関与することが示唆された。

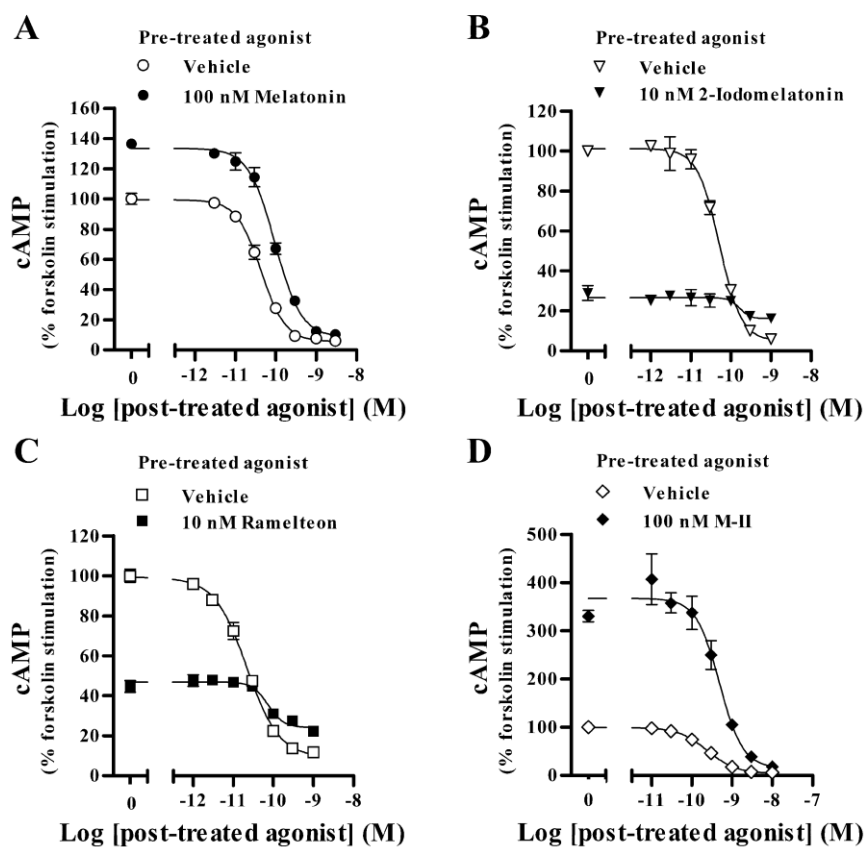


Fig. 8. MT_1 receptor desensitization induced by 2-h treatments with melatonin agonists

CHO-hMT₁ cells were pretreated for 2 h with vehicle or agonist (A, 100 nM melatonin; B, 10 nM 2-iodomelatonin; C, 10 nM ramelteon; D, 100 nM M-II) and then washed. Subsequently, varying concentrations of each agonist were re-added to the cells. Following a 15-min stimulation with forskolin, the cAMP content was determined. Values are expressed as percentages of 10 μM forskolin-stimulated cAMP formation in vehicle-pretreated controls. Data shown are representative of 3 or 4 separate experiments performed in triplicate. IC₅₀ values determined from these curves are summarized in Table 7. The data is cited from our previous report (*Eur J Pharmacol.* **757**, 42-52 (2015), Fig. 6).

Table 7. Changes in functional potencies of melatonin agonists after 2-h pretreatment with agonists

Compound	IC ₅₀ (pM)		ΔpIC ₅₀
	Vehicle	Agonist	
	pretreatment	pretreatment	
Melatonin	75.0 ± 31.1	160.5 ± 64.8	0.33 ± 0.01
2-Iodomelatonin	36.6 ± 11.7	136.4 ± 18.5	0.63 ± 0.12*
Ramelteon	19.2 ± 1.4	61.7 ± 5.8	0.51 ± 0.01
M-II	261.3 ± 26.2	516.2 ± 57.2	0.29 ± 0.01

CHO-hMT₁ cells were preincubated with each agonist (ramelteon and 2-iodomelatonin at 10 nM, melatonin and M-II at 100 nM) for 2 h and then washed and restimulated with agonists (Fig. 8). Potencies of agonists were assessed according to the inhibition of forskolin-stimulated cAMP formation. The magnitude of rightward shifts in the concentration-response curves were quantified as the difference in log IC₅₀ with and without agonist pre-exposure (ΔpIC₅₀). Data are presented as the mean ± S.E.M. of 3 or 4 separate experiments. Data were analyzed using Dunnett's test; * P < 0.05 vs. melatonin-pretreated group. The data is cited from our previous report (*Eur J Pharmacol.* **757**, 42-52 (2015), Table 2).

内在性 MT₁ 受容体発現細胞においても、メラトニン受容体作動薬の作用持続性の違いを確認するため、ラット MT₁ 受容体を発現する膵β細胞株 INS-1 細胞を用いて同様の試験を行った。この INS-1 細胞では、CHO-hMT₁ 細胞と同様にメラトニンが MT₁ 受容体を介して cAMP 産生を抑制することや、センジタイゼーションを引き起こすことが報告されている [58]。また、本試験に用いた INS-1 細胞においてラット MT₁ 受容体の発現を定量的 PCR によって確認した(データ未掲載)。第一章で述べたように、メラトニン受容体作動薬の親和性はヒトとラット MT₁ 受容体間で必ずしも相関しないため、初めに INS-1 細胞膜を用いて各作動薬のラット MT₁ 受容体に対する親和性を調べた [30]。2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの飽和結合試験から、INS-1 細胞膜において高親和性結合部位が存在し、その K_D は 17 ± 2.5 pM、B_{max} は 33 ± 2.7 fmol/mg protein であった (Fig. 9A)。各メラトニン受容体作動薬の親和性を算出するため、2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンとのリガンド競合試験を行った結果、親和性の順位は 2-ヨードメラトニン > メラトニン ≥ ラメルテオン > M-II であった (Table 8)。次にフォルスコリン誘発リン酸化 CREB の増加に対する抑制作用を指標として、作動活性を調べた。各作動薬は濃度依存的にリン酸化 CREB の増加を抑制し、その作動活性の強さの順は親和性の順と一致した (Fig. 9C)。ただし、ヒト MT₁ 受容体に対する作動活性とは対照的に、ラット MT₁ 受容体に対するラメルテオンの作動活性はメラトニンよりもやや弱かった。

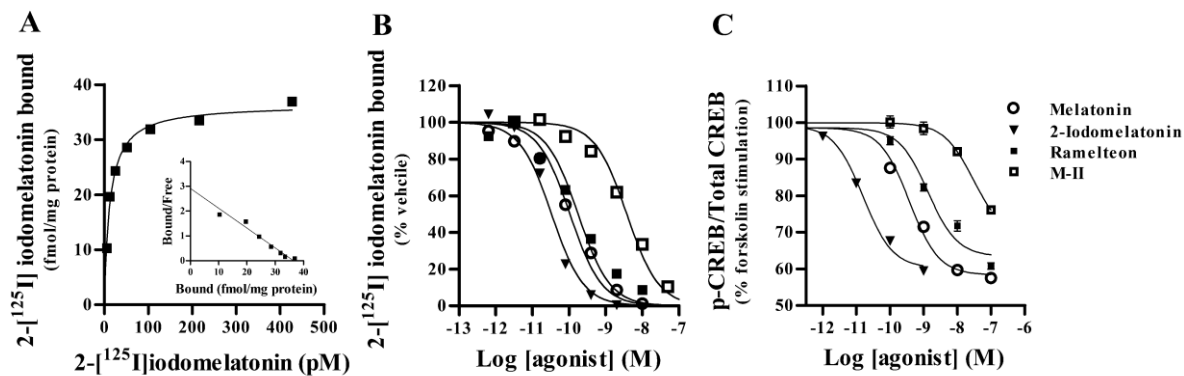


Fig. 9. Affinities and potencies of melatonin agonists for the rat MT_1 receptor in INS-1 cells

(A) Saturation binding of 2-[^{125}I] iodomelatonin to INS-1 clone membranes. Inset, Scatchard plot of saturation data. (B) Competition by melatonin agonists (melatonin, 2-iodomelatonin, ramelteon, and M-II) for 2-[^{125}I] iodomelatonin binding to INS-1 clone membranes. Values are expressed as percentage of specific binding in the vehicle-treated group (100%). (C) Inhibition of forskolin-stimulated CREB phosphorylation in INS-1 cells. INS-1 cells were pretreated with melatonin agonists for 10 min and then stimulated with forskolin (1 μ M) for 30 min. Values are expressed as the ratio of phosphorylated CREB to total CREB in forskolin-stimulated controls (100%). Data are representative of 3 separate experiments performed in duplicate (A and B) or triplicate (C). The parameters determined from these curves are summarized in Table 8. The data is cited from our previous report (*Eur J Pharmacol.* **757**, 42-52 (2015), Fig. 7).

Table 8. Affinity constants (K_i) and functional potencies (IC_{50}) of melatonin receptor agonists for rat MT_1 receptor in INS-1 cells

Compound	Affinity constant (K_i)	Functional potency (IC_{50})
	pM	nM
Melatonin	35 ± 6.6	0.70 ± 0.11
2-Iodomelatonin	11 ± 1.8	0.019 ± 0.0025
Ramelteon	55 ± 12	2.5 ± 0.48
M-II	1000 ± 55	33 ± 9.8

Data are presented as the mean \pm S.E.M. of 3 separate experiments. The data is cited from our previous report (*Eur J Pharmacol.* **757**, 42-52 (2015), Table 3).

β_2 アドレナリン受容体作動薬の報告と類似し、本研究に用いたメラトニン受容体作動薬のヒト

MT₁受容体に対する K_i と K_{off}とは相関する傾向にあった ($r^2 = 0.75$, $P = 0.052$)。そのため INS-1 細胞膜における各作動薬の K_i から、M-II と 2-ヨードメラトニンはラット MT₁ 受容体に対してそれぞれ最も早い、もしくは遅い解離速度を示すと推定された。そこで M-II と 2-ヨードメラトニンを用いて、CHO-hMT₁ 細胞を用いた試験と同様に INS-1 細胞における残存活性を測定した。INS-1 細胞に各作動薬を 2 時間処置し、2 回洗浄後、フォルスコリンにより 30 分間刺激した。その結果、2-ヨードメラトニンはフォルスコリン誘発リン酸化 CREB の増加を抑制したのに対し、M-II は sensitization を引き起こした (Fig. 10)。これらの結果から、2-ヨードメラトニンの持続的な作動活性は CHO-hMT₁ 細胞に特異的な現象ではないことが示された。

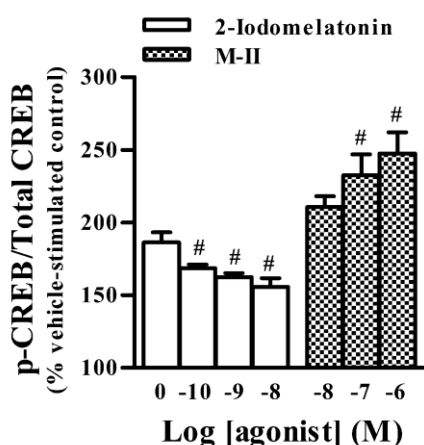


Fig. 10. Changes in forskolin-stimulated CREB phosphorylation following withdrawal of melatonin agonists in INS-1 cells

INS-1 cells were treated with M-II (10 nM–1 μ M) and 2-iodomelatonin (0.1–10 nM) for 2 h, washed, and then stimulated with forskolin (0.1 μ M) for 30 min. Values are expressed as the ratio of phosphorylated CREB to total CREB in the vehicle-pretreated group (100%). Data are presented as the mean \pm S.E.M. of 3 separate experiments performed in triplicate. Data were analyzed using Williams' test; # $P < 0.025$ vs. vehicle-pretreated control. The data is cited from our previous report (*Eur J Pharmacol.* **757**, 42-52 (2015), Fig. 8).

【考察】

本章において、著者は4種のメラトニン受容体作動薬（ラメルテオン、M-II、メラトニン、2-ヨードメラトニン）の*in vitro*における作用持続性およびこれに影響を与える因子を調べた。まず、フォルスコリン誘発cAMP産生量およびリン酸化ERKレベルを指標として、CHO-hMT₁細胞における作用持続時間を検討した。作用持続時間は作動薬間で著しく異なり（2-ヨードメラトニン = ラメルテオン > メラトニン > M-II）、このような違いは内在性ラットMT₁受容体を発現するINS-1細胞においても観察された。さらに、作動薬除去後の残存活性はヒトMT₁受容体からの解離速度と強く相関した。

本研究はメラトニン受容体作動薬の作用持続性の違いを示した最初の報告であろう。*in vitro*および*in vivo*において、メラトニンによるsensitizationがこれまでに報告されており、メラトニンはその除去後、持続的な作動活性を示さないと推定された [57, 59]。すなわち、MT₁受容体を介したアデニル酸シクラーゼの抑制はメラトニン除去に伴い、速やかに消失し、sensitizationを引き起こすと考えられる。本研究においてもメラトニンとM-IIによるsensitizationは薬剤除去直後に生じ、約3時間持続した（Fig. 4B）。一方、ラメルテオンと2-ヨードメラトニンはフォルスコリン誘発cAMP産生を3時間以上持続的に阻害し、薬剤除去24時間後に弱いsensitizationを引き起こした。このようにsensitizationが生じるタイミングは作動薬間で異なっていた。INS-1細胞においても同様に、M-IIは薬剤除去後、速やかにsensitizationを引き起こしたのに対し、2-ヨードメラトニンはフォルスコリン誘発リン酸化CREBの増加を抑制した（Fig. 10）。作動薬間で異なる受容体解離速度が作用持続性およびsensitizationのタイミングの違いを生んでいると推測され、以下のような機序が考えられた。メラトニン受容体作動薬はその解離速度に関わらず、作動薬処置中に受容体を持続的に刺激することによって、sensitizationに必要な変化を誘導する。続いて行う作動薬の除去、洗浄過程によって、早い解離速度をもつ作動薬はアデニル酸シクラーゼの阻害作用を速やかに失い、急速かつ著しいsensitizationを起こす。これとは対照的に、解離速度の遅い作動薬は、受容体から十分解離するまでアデニル酸シクラーゼを阻害し続ける。このような作用持続性の違いはリン酸化ERKを指標とした場合にも観察された（Fig. 5D）。これら*in vitro*における作用持続性の知見を*in vivo*に適用するためには、組織や動物レベルにおけるさらなる研究が必要である。

[³H]-メラトニンや2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンのような放射ラベルリガンド自体の解離速度研究はこれまでに多く報告されている。このような放射ラベルリガンドの解離速度算出は、非常に正確な速度定数を求めることができるものの、対象とするリガンドを直接放射ラベル化する必要がある。本研究では非放射ラベルリガンドの解離速度定数を間接的に測定できる方法として、遅延性放射リガンド結合法を用いた [53]。この方法の妥当性は、既存報告の[³H]-メラトニン、2-[¹²⁵I]ヨードメラトニンの解離速度と、本方法を用いて算出した非放射ラベルメラトニン、2-ヨードメラトニンの解離速度を比較することで検証した。報告されている2-[¹²⁵I]ヨードメラトニン、[³H]メラトニンのk_{off}はそれぞれ0.018 min⁻¹、0.056 min⁻¹であり、本試験で算出した各k_{off}0.0119 min⁻¹、0.0447 min⁻¹と良く一致した（Table 6） [52, 60]。さらに他の間接的な速度算出方法である共添加試験（co-incubation experiment）を用いれば、ラメルテオン、M-IIのk_{off}も確認できるであろう [61]。

作動薬の残存活性と推定される寄与因子との相関解析から、細胞膜への非特異的結合に関与す

るリガンドの脂溶性ではなく、解離速度が作用持続性に関与することが示唆された (Fig. 7)。ただし、リガンドの受容体への再結合 (rebinding) や受容体の非活性部位への結合 (exosite binding) も関与する可能性は残っている [42, 44]。ただし、長い作用持続性を示す 2-ヨードメラトニンが最も強く脱感作を引き起こしたことから、脱感作は作用持続性に関与しないと考えられる (Table 7)。

以上の結果より、ヒト MT_1 受容体発現 CHO 細胞および INS-1 細胞において、メラトニン受容体作動薬は異なる作用持続時間を持ち、受容体解離速度がラメルテオンの作用持続性に関与することが示唆された。

第3章 ラット膵β細胞株INS-1におけるラメルテオンの処置時間依存的な細胞内シグナルの変化

【緒言】

メラトニンシグナルの異常と2型糖尿病との強い関連性がヒトおよび動物モデルにおいて報告されている。メラトニンのげっ歯類への長期投与は、高血糖や高インスリン血症などの異常なグルコース代謝を改善した [62, 63]。同様に、徐放性メラトニンの長期投与は糖尿病をもつ不眠患者のHbA1cレベルを改善した [64]。また、メラトニンの分泌量低下は2型糖尿病発症リスクの増加と関係しており、メラトニン低分泌群の発症率は高分泌群に比べて約2倍高かった [65]。膵臓はメラトニンによる糖代謝調節作用の標的組織の可能性があり、事実、メラトニンはげっ歯類の膵島細胞やINS-1細胞において、フォルスコリンや高グルコース刺激によるインスリン分泌を阻害する [58, 66]。また、MT₁およびMT₂受容体欠損マウスを用いた研究から、メラトニンのこのような作用は主にMT₁受容体を介していることが報告されている [67]。

概日時計は行動に周期性を与える内因性の振動体であり、体内の代謝過程と予期された行動とを同調させる。概日リズムは分子レベルにおいて、Clock、Bmal1などの転写活性化因子とPer1、Cry1などの転写抑制因子が互いに制御し合うフィードバックループにより構成されている [68]。糖代謝などの代謝制御における概日時計の重要性は、時計遺伝子の変異が代謝関連遺伝子の周期的発現に障害を与え、代謝疾患を引き起こすといった報告から示唆されている [69]。例えば、Clock遺伝子の変異マウスやBmal1欠損マウスは、耐糖能やインスリン分泌能の異常が認められる [70]。興味深いことに、Bmal1欠損マウスの膵島細胞では、インスリンの開口放出が顕著に障害されている。これらの代謝異常は時計遺伝子発現の下流にある現象によって引き起こされているのであろう [69]。

これまでに様々な細胞種において、メラトニンが時計遺伝子の発現に直接影響を与えることが示されている [71]。しかしながら、これらの実験結果は一致しておらず、使用細胞種やメラトニンの暴露時間、濃度などの実験条件の違いに起因しているのかもしれない [72-74]。例えば、MT₁受容体が高発現し、季節性の神経内分泌反応を制御している下垂体隆起部では、メラトニンの暴露時間に依存した発現変動が報告されている [75]。特に von Gall らの報告では、下垂体隆起部のMT₁受容体を長時間刺激することによって、アデノシン A2b 受容体を介した cAMP シグナルが増強され、Per1 の周期的発現変動を引き起こした [59]。このような現象は、第2章で述べた cAMP シグナルの sensitization が関与すると考えられている。さらに、MT₁受容体欠損マウスや松果体除去マウスを用いた研究から、MT₁受容体を介したメラトニンシグナルが、下垂体隆起部におけるいくつかの時計遺伝子 (Per1、Cry1、Rev-erba) の概日リズムおよび発現レベルに重要な役割をもつことが示されている [76, 77]。しかしながら、膵β細胞の時計遺伝子発現に対するMT₁受容体シグナルおよびその持続性の役割はほとんど明らかになっていない。このような情報は、メラトニン受容体作動薬の時計遺伝子発現を介したβ細胞機能への影響を理解するうえで有用であろう。

本章ではこのような背景から内在性MT₁受容体を発現する細胞としてINS-1細胞を選択し、ラメルテオンの処置時間依存的な細胞内シグナルの変化を調べるため、ラメルテオン処置およびその除去後においてリン酸化CREB、インスリン分泌および時計遺伝子発現の変化を検討した。

【方法】

1. 試薬

ラメルテオン ((S)-N-[2-(1,6,7,8-tetrahydro-2H-indeno-[5,4-b]furan-8-yl)ethyl] propionamide) は武田薬品工業株式会社 (Osaka, Japan) にて合成された。H89、2', 5'-dideoxyadenosine、GSK4112 は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。ルジンドールは Tocris Cookson (Bristol, UK) から、フォルスコリンは Merck Millipore (Darmstadt, Germany) から入手した。

2. 細胞培養

INS-1 細胞の培養は、第二章の【方法】2. 細胞培養と同様に実施した。

3. リン酸化 CREB 測定試験

INS-1 細胞をポリエルリジンコートした 96 ウェルプレート (4.7×10^4 細胞/cm²) に播種して 1.5–2 日間培養した。対照溶媒もしくは化合物 (ルジンドールもしくはフォルスコリン存在、非存在下において、ラメルテオン、H89、もしくは 2', 5'-dideoxyadenosine) を細胞に加え、0.1% ウン胎児血清含有 RPMI1640 培地中にて、2–14 時間培養した。sensitization の試験では、細胞を 0.2% BSA を含む Krebs-Ringer bicarbonate HEPES バッファー (アッセイバッファー) で 2 回洗浄後、30 分間アッセイバッファー中で培養してから、フォルスコリン刺激 (0.1 μ M) を 30 分間行った。その後の細胞固定、免疫細胞染色は、第二章の【方法】9. リン酸化 CREB 測定試験と同様に実施し、各ウェルの蛍光強度を測定した。

4. インスリン分泌試験

前述のリン酸化 CREB 測定試験と同様に、ラメルテオンを INS-1 細胞に前処置した。処置 2 もしくは 14 時間後に培地を回収し、培地中のインスリン濃度測定まで -80°C 下にて保存した。sensitization および Rev-erba 作動薬試験においては、アッセイバッファーにて細胞を 2 回洗浄後、30 分間アッセイバッファー中で培養した。その後、2 時間フォルスコリン (10 μ M) もしくは 30 分間 GSK4112 (10 μ M) 刺激を行った。培地上清中のインスリン濃度は、AlphaLISA Insulin Kit (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) を用いて測定した。

5. 定量的遺伝子発現測定試験

INS-1 細胞をポリエルリジンコートした 24 ウェルプレート (4.7×10^4 細胞/cm²) に播種して 2 日間培養した。その後、前述のリン酸化 CREB 測定試験と同様の方法により、化合物を 2–14 時間処置した。フォルスコリンおよび高グルコース刺激による時計遺伝子の周期的発現誘導は、下記のように実施した。グルコースおよび血清不含 RPMI 1640 培地を用いて、ラメルテオン前処置細胞を 2 回洗浄し、1.5 時間培養した。次いでフォルスコリン (0.1 μ M) および高グルコース (12 mM) を含む RPMI 1640 培地に交換し、1.5 時間刺激した。さらに 6 mM グルコースを含む RPMI 1640 培地に変え、各時間 (0、1、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 時間) 培養後、細胞を RLT バッファー (Qiagen, Valencia, CA, USA) にて溶解し -80°C 下にて保存した。RNeasy 96 Kit および DNase I (Qiagen) を用いて、添付プロトコールに従い、トータル RNA を抽出した。RNA

は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて cDNA に逆転写した後、下記のように反応液を調製した。総 20 μ L/well の反応液になるように、ペアとなるプライマー、FAM もしくは HEX ラベル化 TaqMan プロブ、cDNA サンプルもしくは標準 DNA テンプレート (copy numbers、 1×10^2 – 1×10^7)、quantitative real-time polymerase chain reaction MasterMix (Eurogentec, Seraing, Belgium) を各ウェルに入れて調製した。プライマーとプロブの DNA 配列は Table 9 に示す。7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて、下記の反応条件 (50°C 下 2 分、95°C 下 10 分を 1 サイクル、続いて 95°C 下 15 秒、60°C 下 1 分を 40 サイクル) によって定量的 PCR を行った。標的遺伝子と参照遺伝子 (ラットシクロフィリン A) の発現量は、絶対定量もしくは $\Delta\Delta$ Ct 法を用いた相対定量によって算出した。標的遺伝子の発現量は参照遺伝子発現量によって標準化した。

Table 9. Primer and probe sequences for quantitative real-time polymerase chain reaction

Gene symbol		Non-labeled primer (5'–3')	TaqMan probe (5'–3')
Nr1d1	F	CAGCGAGAAGCTCAACTCTCT	CCGTGAAAAGGCCAGCTCCTCCTC
		G	AG
	R	CCATTCCCGAGCGGTCTGC	
Arntl	F	GGTCGAATGATTGCCGAGGAA	ACAGGATAAGAGGGTCATCACCTTC
			CAGC
	R	CGTACTTGTGATGTTTCAGTGG	
		G	
Clock	F	TCCCAGTCAGTTGGTTCATCAT	CACAGCCAGCGATGTCTCAAGCTGC
		TA	AA
	R	CTGAGCTGAAAGCTGAAACTG	
		TG	
Per1	F	CAGGCTTCGTGGGCTTGAC	CCTTCAGCCCCTGGTTGCCACCATG
	R	CAGTGGTGTTCGGCGACCA	
Per2	F	AGAGGTTTCATCCGTGGGTCC	ACACACCCTGTTACGTCGATGGCGG
			TA
	R	TTGCCTTTCTCCTCACTTTAC	
		A	
Cry1	F	TGCTCCTGGAGAGAATGTCCC	CCACTTCCTTGAGAGCAGTTTCCGCC

			AC
	R	TGGGTTAGTTTGCTGACTGTCT C	
Cry2	F	AGCACTTGGAACGGAAGGC	TCCGAGGTCTCTCATAGTTGGCAACC C
	R	GCCAGCAAGGAATTGGCATT	
PGC-1 α	F	GAGAGTATGAGAAGCGGGAG TC	ACACGGCGCTCTTCAATTGCTTTCTG CT
	R	GTCAGGTCTGATTTTACCAAC GTAA	
Srebfl	F	CGCTCTTGACCGACATCGAA	CAACAACCAAGACAGTGACTTCCCT GGC
	R	GCCTGTGTCTCCTGTCTCAC	
Fasn	F	CGCCAGAGCCCTTTGTTAATT G	TGGGACACCCTGAGCCTGCCTCG
	R	CTAGGGATAACAGCACCTTGG TC	
Rplp0	F	GGGCATCACCCTAAAATCTC CA	ACCATTGAAATCCTGAGCGATGTGC AGCT
	R	TCCCACCTTGTCTCCAGTCTTT A	

F: forward primer, R: reverse primer

The data is cited from our previous report (*PLoS One.* **9**, e102073 (2014), Table 1).

6. ウェスタンブロット解析

ラメルテオンを INS-1 細胞に 14 時間処置した後、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma-Aldrich) を含む細胞抽出バッファー (Invitrogen) を加えて、ホモジナイズした。細胞ライセートの不溶性画分を遠心 (15,000 × g, 20 分) によって除去し、上清中の蛋白質濃度を bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce, Hercules, CA) を用いて測定した。ビストリスゲル (4–12%) の各ウェルに細胞

ライセートを各 10 μg ずつ入れ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その後、PVDF 膜 (Invitrogen) に蛋白質を転写し、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer solution (Toyobo, Osaka, Japan) で希釈した anti-NR1D1 antibody (AB40523, 1:600; Abcam, Cambridge, UK) 、anti- β -actin antibody (A-5441, 1:10,000; Sigma-Aldrich) によって、目的蛋白質を検出した。

7. データ解析

結果は平均値 \pm 標準誤差で表した。図は 2 回以上独立して実施した試験の代表結果を示す。すべての統計計算は SAS software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。処置時間の違いは二元配置分散分析を行った後、ダンネット多重比較検定により有意差を検定し、有意水準を $P < 0.05$ とした。濃度依存性試験における各濃度処置群と対照群との比較は、片側ウィリアム検定を行い、有意水準を $P < 0.025$ とした。

【結果】

本試験ではラット腭島細胞と同様、MT₁受容体の発現が報告されている INS-1 細胞を使用した [78, 79]。ラメルテオンの処置時間依存的な cAMP シグナルの変化を調べるため、ラメルテオン処置中およびその除去後のリン酸化 CREB レベルを検討した。これまでの報告から、短時間 (0.5–4 時間) のメラトニン処置は、cAMP シグナル (リン酸化 CREB および cAMP response element を介した遺伝子発現) を阻害することが分かっている [58, 79]。さらに長時間の変化を検討するため、処置時間を 14 時間まで延長した。ラメルテオンを 2–14 時間処置している間、リン酸化 CREB レベルは用量依存的かつ持続的に低下し、2 時間処置群と 14 時間処置群との間に顕著な差はなかった (Fig. 11A, B)。第 2 章で述べた M-II やすでに報告されているメラトニンと同様、ラメルテオン処置後に細胞を洗浄し、フォルスコリン刺激することによって sensitization、すなわちフォルスコリンによるリン酸化 CREB 増加の増強作用が観察された (Fig. 11C, D)。その増強作用は処置時間が長いほど、また濃度が高いほど顕著であった (Fig. 11D)。

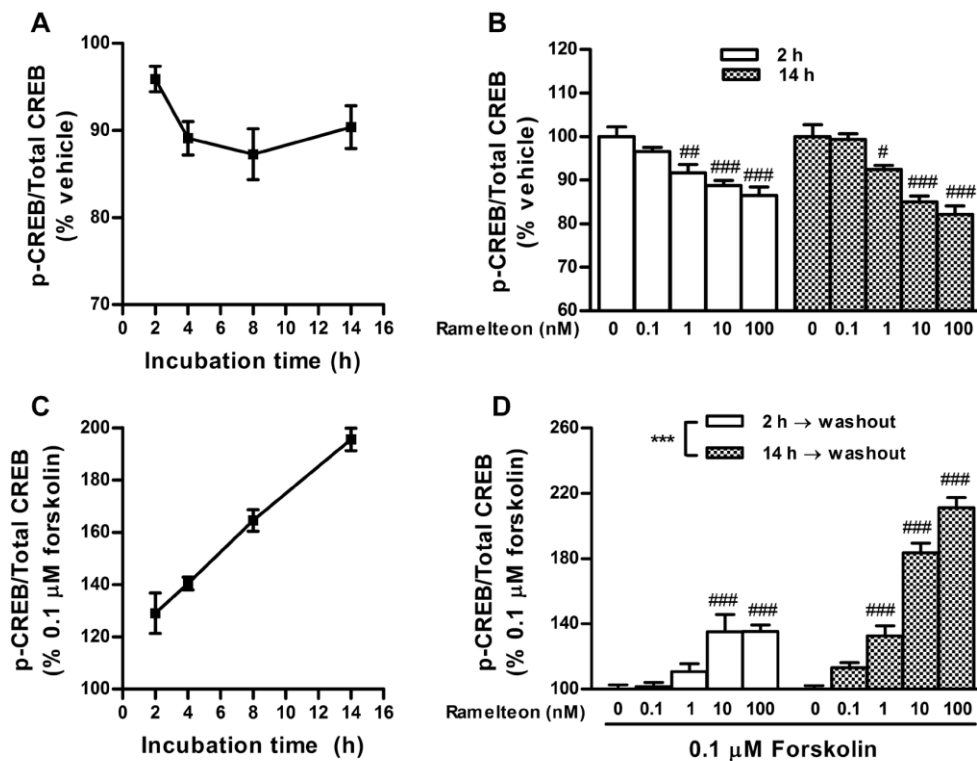


Fig. 11. Duration-dependent changes in CREB phosphorylation during ramelteon treatment and after washout.

(A) INS-1 cells were treated with ramelteon (10 nM) for 2, 4, 8, or 14 h. (B) Concentration-dependent decreases in CREB phosphorylation were assessed after ramelteon (0.1–100 nM) treatment for 2 and 14 h. (C) After ramelteon (10 nM) treatment for 2, 4, 8, or 14 h, the cells were washed twice and stimulated with forskolin (0.1 μM) for 30 min in the absence of ramelteon. (D) Concentration-dependent potentiation of forskolin-stimulated CREB phosphorylation was assessed after ramelteon (0.1–100 nM) treatment for 2 and 14 h. Values are expressed as the ratio of phosphorylated CREB to total CREB in the vehicle-pretreated

control (100%). Data are presented as means \pm SEM ($n = 3$) and were analyzed using 2-way analysis of variance followed by Dunnett's test. *** $P < 0.001$, 2 h treatment vs. 14 h treatment; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. vehicle-pretreated control. The data is cited from our previous report (*PLoS One*. **9**, e102073 (2014), Fig. 1).

ラメルテオン誘発 sensitization におけるメラトニン受容体および cAMP シグナルの関与を明らかにするため、ラメルテオン添加時にメラトニン受容体拮抗薬ルジンドールもしくはフォルスコリンを同時処置した。ルジンドールとフォルスコリンは共にラメルテオンによる sensitization を阻害した (Fig. 12A)。さらにアデニル酸シクラーゼ阻害剤 2', 5'-dideoxyadenosine および PKA 阻害剤 H89 を 14 時間処置した際、同様の sensitization が観察され、その作用は処置時間が長いほど明確であった (Fig. 12B)。これらの結果から、ラメルテオンによる sensitization はメラトニン受容体を介した cAMP シグナルの阻害に起因していると考えられた。

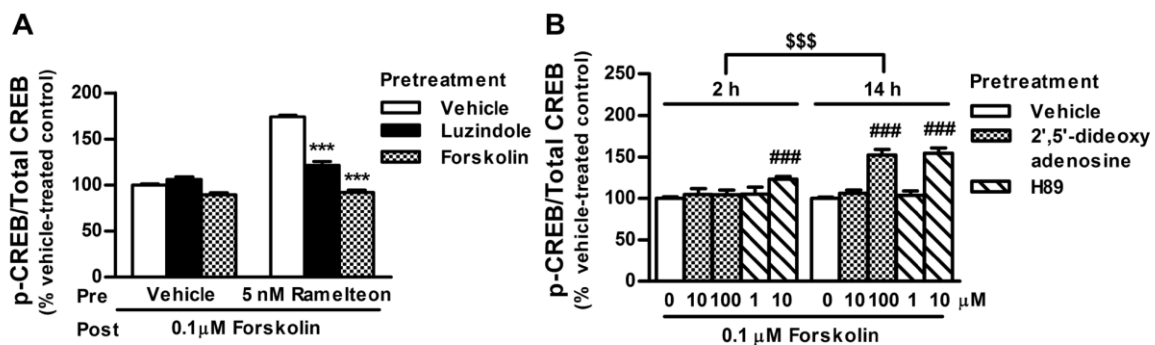


Fig. 12. Blockade of ramelteon-induced potentiation of CREB phosphorylation by luzindole and forskolin.

(A) INS-1 cells were incubated with ramelteon (5 nM) in the absence or presence of luzindole (15 μ M) or forskolin (0.1 μ M) for 14 h. After drug washout, the cells were subjected to a second round of forskolin stimulation (0.1 μ M) for 30 min. (B) INS-1 cells were incubated with 2',5'-dideoxyadenosine (10 or 100 μ M) and H89 (1 or 10 μ M) for 2 or 14 h. After drug washout, the cells were stimulated with forskolin (0.1 μ M) for 30 min. Values are expressed as the ratio of phosphorylated CREB to total CREB in the vehicle-pretreated control (100%). Data are presented as means \pm SEM ($n = 3-6$) and were analyzed using 2-way analysis of variance followed by Dunnett's test. *** $P < 0.001$ vs. ramelteon-pretreated control; ### $P < 0.001$ vs. vehicle-pretreated control; \$\$\$ $P < 0.001$, 2 h treatment vs. 14 h treatment. The data is cited from our previous report (*PLoS One*. **9**, e102073 (2014), Fig. 2).

cAMP はインスリン分泌に関与する最も重要なシグナル分子のひとつであり、INS-1 細胞における細胞内 cAMP の分解阻害や細胞外への cAMP 流出阻害は、インスリン分泌を増加させることが報告されている [80]。処置時間依存的な細胞機能の変化を調べるため、リン酸化 CREB 試験と同様の試験デザインを用いて、INS-1 細胞からのインスリン分泌を測定した。2 および 14 時間のラメルテオン処置は共にインスリン分泌量を有意に低下させた (Fig. 13A)。また、ラメルテオンの

14 時間処置群は 2 時間処置群よりも顕著にインスリン分泌量が低かった。さらに、14 時間処置群においてのみ、ラメルテオン除去後のフォルスコリン誘発インスリン分泌が増強された (Fig. 13B)。この sensitization はルジンドールによって阻害された (Fig. 13C)。リン酸化 CREB の結果を併せて考えると、ラメルテオンはメラトニン受容体を介して長時間 (14 時間) cAMP シグナルを持続的に阻害することが可能であり、その結果、除去後の著しい sensitization を引き起こすことが示唆された。

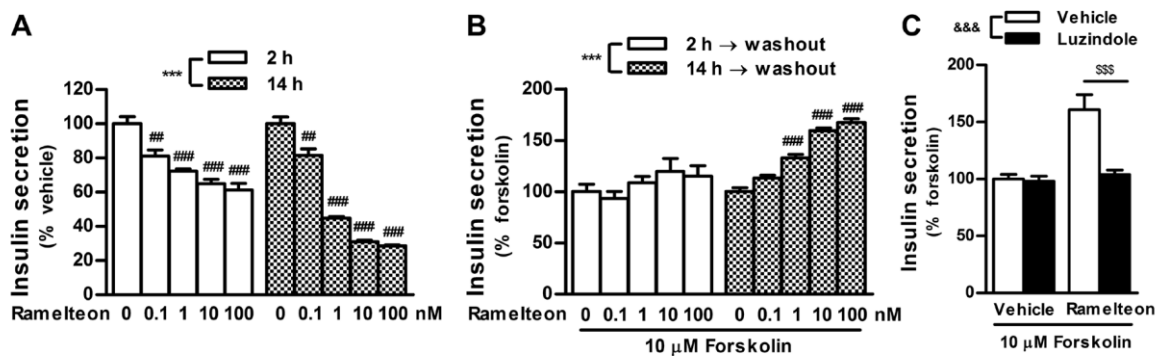


Fig. 13. Duration-dependent changes in insulin secretion during ramelteon treatment and after drug washout.

(A) INS-1 cells were treated with ramelteon (0.1–100 nM) for 2 or 14 h. (B) After ramelteon treatment for 2 or 14 h, the cells were washed twice and stimulated with forskolin (10 μ M) for 2 h in the absence of ramelteon. (C) The cells were incubated with ramelteon (10 nM) in the absence or presence of luzindole (30 μ M) for 14 h. After drug washout, the cells were stimulated with forskolin (10 μ M) for 2 h. Values are expressed as the percentage of the vehicle- (A) or forskolin (10 μ M; B and C)-stimulated insulin release in vehicle-pretreated controls. Data are presented as means \pm SEM (n = 6) and were analyzed using 2-way analysis of variance followed by Dunnett's test. ***P < 0.001, 2 h treatment vs. 14 h treatment; ##P < 0.01, ###P < 0.001 vs. vehicle-pretreated control; &&&P < 0.001, luzindole group vs. vehicle group; \$\$\$P < 0.001 vs. ramelteon-pretreated control. The data is cited from our previous report (*PLoS One*, **9**, e102073 (2014), Fig. 3).

cAMP シグナルを介した CREB の活性化は概日時計遺伝子の発現制御に関与している [81, 82]。そこで、前述のリン酸化 CREB 試験の結果に基づき、ラメルテオンおよびフォルスコリンによる 7 つの時計遺伝子 (Rev-erba、Bmal1、Clock、Per1、Per2、Cry1、Cry2) の mRNA 発現変動を検討した。ラメルテオンは Rev-erba の mRNA 発現を処置時間および用量依存的に増加させた (Fig. 14A、15A)。一方、ラメルテオンは Bmal 1 の発現を徐々に低下させ、これは Rev-erba が転写抑制因子として Bmal 1 の mRNA 発現を直接抑制することと一致している (Fig. 14A、15B) [83]。これらとは対照的に、Per1 と Per2 の発現はラメルテオン添加後、急激に低下した。また、Per1 の発現は処置 14 時間後までに回復し、Per2 の発現に関してはむしろ増加した (Fig. 14C、15D および E)。Clock の発現はラメルテオンによってほとんど変化しなかった (Fig. 14A、15C)。報告されてい

る下垂体隆起部におけるメラトニンの作用とは異なり、INS-1 細胞ではラメルテオンによって Cry1、Cry2 の発現が増加せず、むしろ減少させる傾向にあった (Fig. 14C、15F および G)。興味深いことに、フォルスコリンによる時計遺伝子発現変動は、ラメルテオンとほぼ反対の変動パターンを示した (Fig. 14B および D)。以上の結果から、ラメルテオンは濃度、処置時間依存的に時計遺伝子群の mRNA 発現を変動させ、このような作用は cAMP シグナル経路を介している可能性が示唆された。

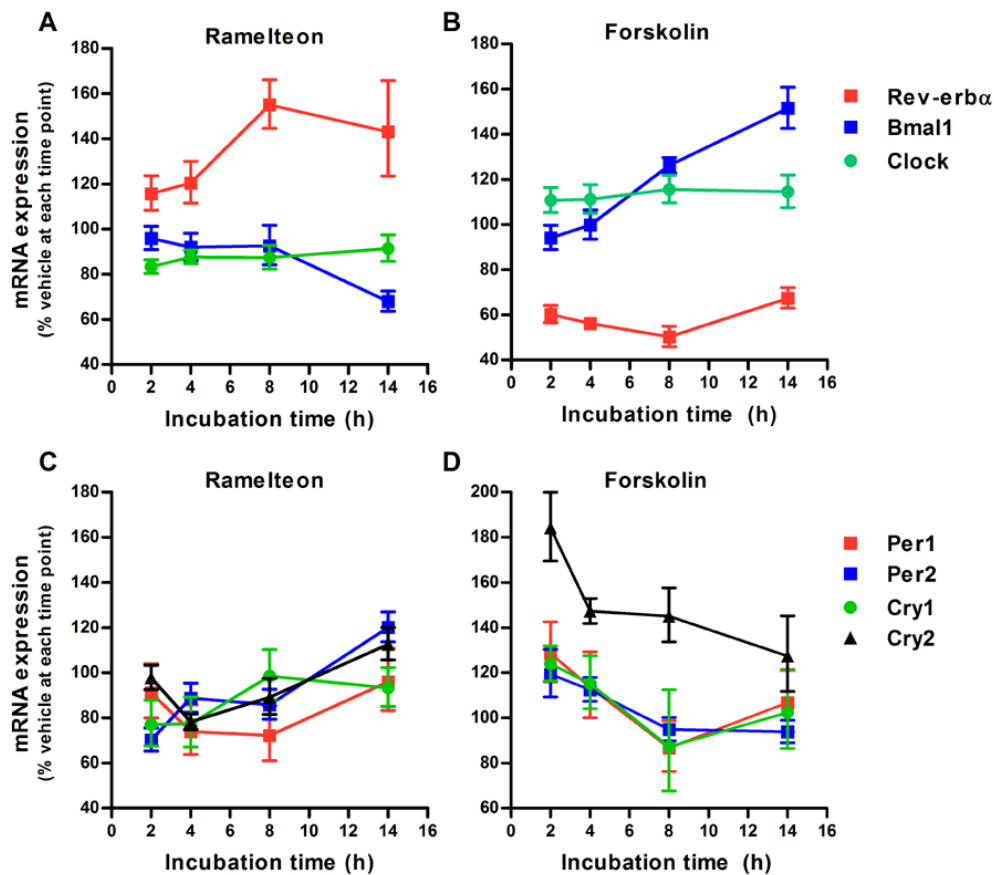


Fig. 14. Duration-dependent changes in ramelteon-induced clock gene expression. INS-1 cells were treated with ramelteon (A and C; 10 nM) and forskolin (B and D; 0.1 μ M) for 2, 4, 8, and 14 h. mRNA expression of Rev-erba, Bmal1, Clock, Per1, Per2, Cry1, and Cry2 was assessed using TaqMan polymerase chain reaction and normalized to that of the housekeeping gene cyclophilin A. Values are expressed as a percentage of the vehicle-treated control at each time point. Data are presented as means \pm SEM (n = 4). The data is cited from our previous report (*PLoS One*. 9, e102073 (2014), Fig. 4).

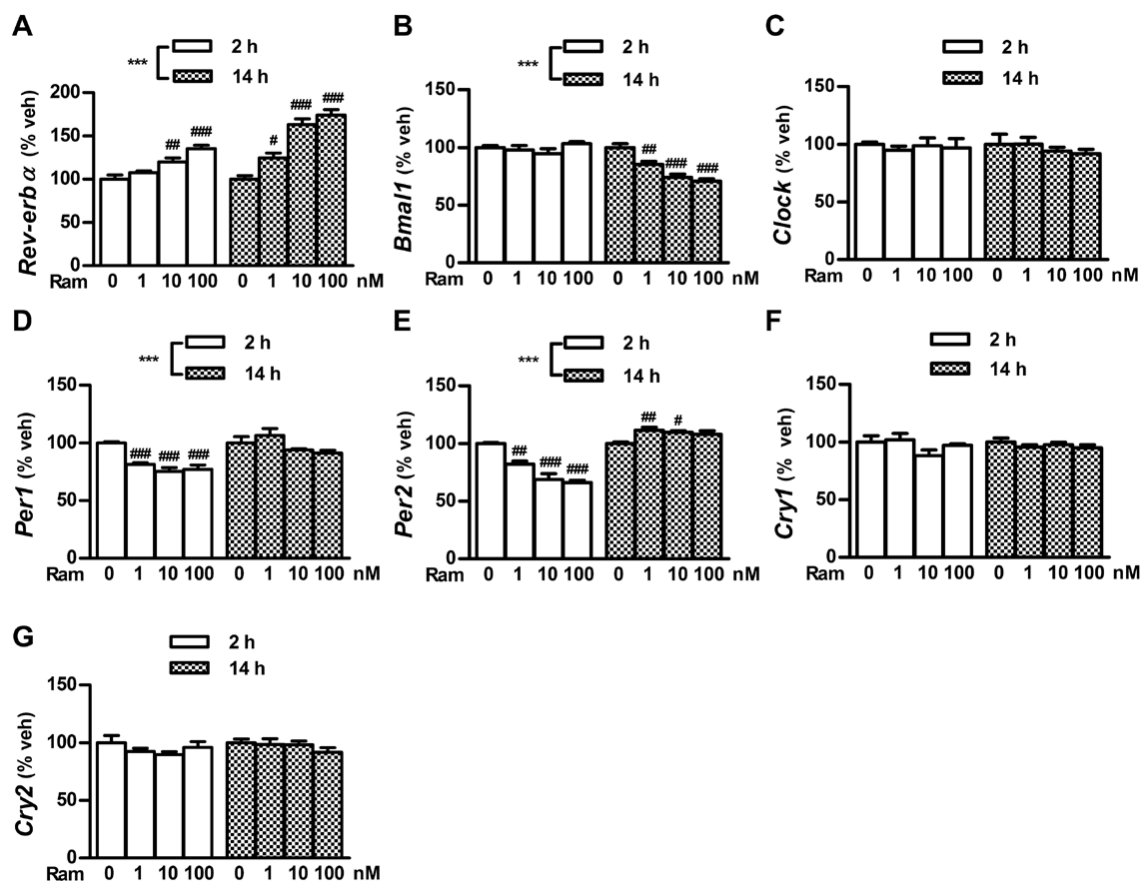


Fig. 15. Concentration-dependent changes in ramelteon-induced clock gene expression. INS-1 cells were treated with ramelteon (1, 10, or 100 nM) for 2 or 14 h.

mRNA expression of Rev-erba (A), Bmal1 (B), Clock (C), Per1 (D), Per2 (E), Cry1 (F), and Cry2 (G) was assessed using TaqMan polymerase chain reaction and normalized to that of the housekeeping gene cyclophilin A. Values are expressed as a percentage of the vehicle-treated control. Data are presented as means \pm SEM ($n = 4$) and were analyzed using 2-way analysis of variance followed by Dunnett's test. *** $P < 0.001$, 2 h treatment vs. 14 h treatment; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. vehicle-treated control. The data is cited from our previous report (*PLoS One*. **9**, e102073 (2014), Fig. 5).

Rev-erba は sterol regulatory element-binding protein 1c (Srebp-1c) などが関与する肝脂質代謝を制御しており、Rev-erba 作動薬は肝臓における脂質やコレステロール合成を阻害する [69, 84]。さらに Rev-erba は膵島 α 、 β 細胞において、それぞれグルカゴン、インスリンの分泌を制御することが示されている [85, 86]。そこで、ラメルテオンによる Rev-erba 発現増加に着目し、ラメルテオンによる Rev-erba シグナルの活性化を調べた。まず、14 時間ラメルテオン処置後の Rev-erba 蛋白質量およびその下流シグナルの変化を検討した。ウェスタンブロット解析からラメルテオンは濃度依存的に Rev-erba 蛋白質を増加させた (Fig. 16A)。同様に、Rev-erba の過剰発現もしくは活性化によって減少すると報告されている 3 遺伝子 (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator (PGC-1 α)、Srebp-1c、fatty acid synthase (FAS)) の mRNA 発現変化を調べた [84, 87]。

ラメルテオンは PGC-1 α の発現を著しく低下させ、また Srebp-1c、FAS の発現をわずかながら減少させた (Fig. 16B–D)。さらにラメルテオンは 14 時間前処置により Rev-erb α 作動薬 GSK4112 によるインスリン分泌増加を促進した (Fig. 16E)。これらの結果から、ラメルテオンの長時間処置は Rev-erb α シグナルを増強することが示唆された。

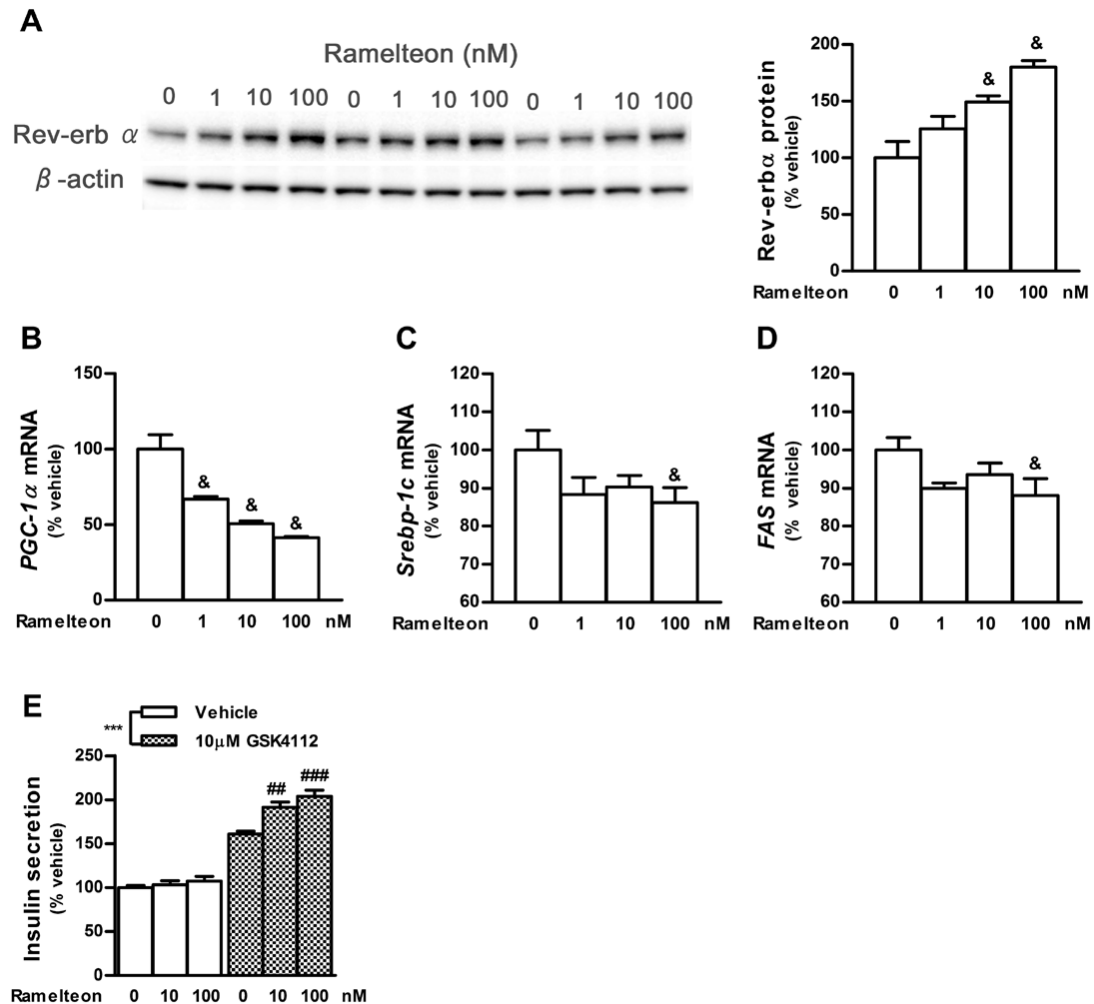


Fig. 16. Activation of Rev-erb α signaling by ramelteon treatment for 14 h. INS-1 cells were treated with ramelteon (1, 10, or 100 nM) for 14 h.

(A) Expression levels of Rev-erb α protein were detected by western blot analysis. (B–D) Expression of Rev-erb α -regulated genes (PGC-1 α , Srebp-1c, and FAS) was measured using TaqMan polymerase chain reaction and normalized to that of the housekeeping gene cyclophilin A. (E) After ramelteon (10 or 100 nM) treatment for 14 h, the cells were washed and stimulated with the Rev-erb α agonist GSK4112 (10 μ M). After 30 min, the amount of insulin secretion was measured. Data are presented as means \pm SEM (A, n = 3; B–D, n = 4; E, n = 6) and were analyzed using Williams' test (A–D) or 2-way analysis of variance followed by Dunnett's test (E). $\&$ P < 0.025 vs. vehicle-treated control; ***P < 0.001, vehicle vs. GSK4112 treatment; ##P < 0.01, ###P < 0.001 vs. GSK4112-treated control. The data is cited from our previous report (*PLoS One*, 9, e102073 (2014), Fig. 6).

ラメルテオンによる *Rev-erba*、*Bmal1* の発現変動において、メラトニン受容体の下流 cAMP シグナル経路の関与を明らかにするため、ラメルテオンとルジンドール、もしくはフォルスコリンを 14 時間同時処置した。ルジンドールおよびフォルスコリンは、共にラメルテオンによる *Rev-erba*、*Bmal1* の発現変動を阻害した (Fig. 17A–D)。ラメルテオンはメラトニン受容体下流の cAMP シグナルを介して、*Rev-erba*、*Bmal1* の発現を変動させているのであろう。また、同様にフォルスコリンはラメルテオンによる *PGC-1α*、*Srebp-1C*、*FAS* の発現抑制も阻害した (データ未掲載)。

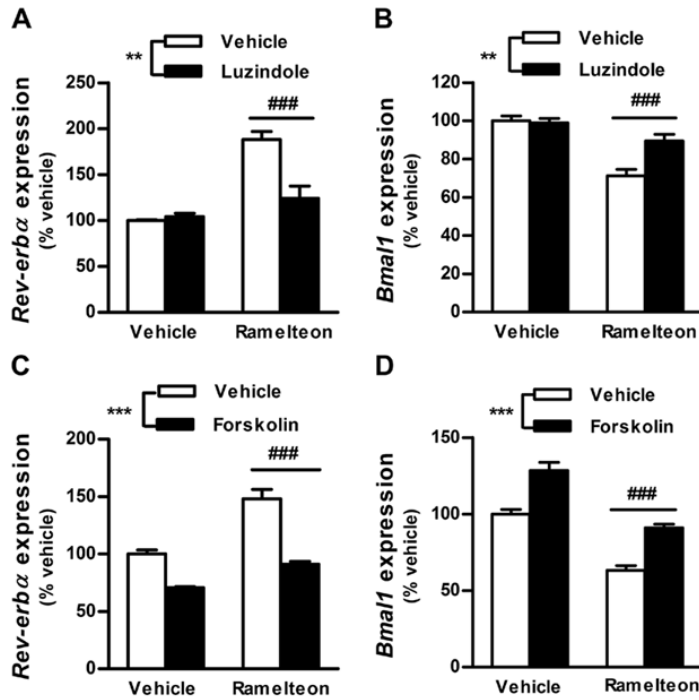


Fig. 17. Blockade of ramelteon-induced *Rev-erba* expression by luzindole and forskolin.

INS-1 cells were incubated with ramelteon (A and B, 5 nM; C and D, 10 nM) in the absence or presence of luzindole (A and B, 15 μ M) or forskolin (C and D, 0.1 μ M) for 14 h. mRNA expression of *Rev-erba* and *Bmal1* was measured using TaqMan polymerase chain reaction and normalized to that of the housekeeping gene cyclophilin A. Values are expressed as a percentage of vehicle-treated controls. Data are presented as means \pm SEM ($n = 4-6$) and were analyzed using 2-way analysis of variance followed by Dunnett's test. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. vehicle-pretreated group; ### $P < 0.001$ vs. ramelteon-pretreated control. The data is cited from our previous report (*PLoS One*, **9**, e102073 (2014), Fig. 7).

前述したようにげっ歯類の下垂体隆起部において、メラトニンは cAMP シグナルの sensitization に依存して、*Per1* の周期的発現を誘発することが報告されている [59]。したがって、INS-1 細胞においてもメラトニン受容体作動薬は時計遺伝子の周期的発現を誘導する可能性がある。この仮説を検証するため、10 nM のラメルテオンを短時間 (2 時間) もしくは長時間 (14 時間) 処置および洗浄後、時計遺伝子発現を経時的に 48 時間測定した。培養細胞においてフォルスコリンが時計遺伝子の周期的発現を誘導する知見に基づき、本試験ではラメルテオン除去後にグルコースを

含まない培地で 1.5 時間培養してから、フォルスコリン (0.1 μM) と高グルコース (12 mM) による刺激を用いた [82, 88]。ラメルテオンの長時間処置群は短時間前処置群と比べ、*Rev-erba* と *Bmal1* の周期的発現の変動幅を大きくした (Fig. 18A および B)。これとは対照的に、*Clock* の発現は処置時間の違いによる差が小さかった (Fig. 18C)。フォルスコリンと高グルコース刺激直後、*Per1* の発現が誘導され、ラメルテオンの長時間前処置によりその発現は増強された (Fig. 18D)。以上から、ラメルテオンの長時間前処置はその除去後において *Rev-erba* と *Bmal1* の周期的発現を増大することが示された。

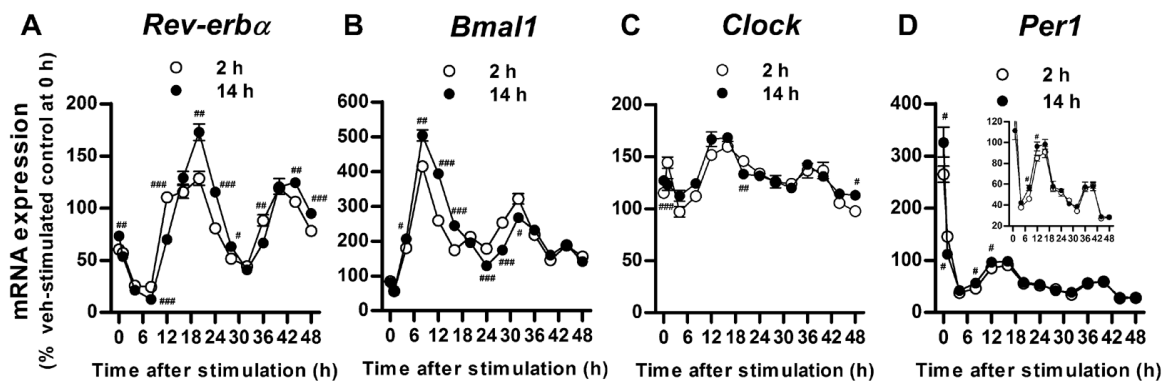


Fig. 18. Time course of clock gene expression after ramelteon pretreatment followed by forskolin and high glucose stimulation.

INS-1 cells were pretreated with ramelteon (10 nM) for 2 h or 14 h (A–D). After the washout period, the cells were stimulated with forskolin (0.1 μM) and high glucose (12 mM) for 1.5 h. Following removal of the stimulant, the cells were incubated in a serum-free medium for 0–48 h. Clock gene expression was assessed by TaqMan polymerase chain reaction and normalized to that of the housekeeping gene cyclophilin A. Values are expressed as the percentage of vehicle-stimulated controls at 0 h after stimulant removal. Data are presented as means \pm SEM ($n = 3$) and were analyzed using 2-way analysis of variance followed by Dunnett’s test. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. 2 h-pretreated control at each time point. The data is cited from our previous report (*PLoS One*. 9, e102073 (2014), Fig. 8).

【考察】

本章において、著者は INS-1 細胞におけるラメルテオンの処置時間依存的な細胞内シグナルの変化を見出した。このような変化には cAMP シグナル経路が関与していた。ラメルテオンを処置している間、リン酸化 CREB やインスリン分泌などの cAMP シグナルが持続的に抑制された。一方、ラメルテオン除去後、cAMP シグナルの sensitization が前処置時間に比例して生じた。また、ラメルテオンは処置時間依存的に時計遺伝子の発現を変動させた。特に *Rev-erba* の発現はラメルテオンの長時間処置により増加し、下流のシグナルも促進された。さらにラメルテオン除去後、フォルスコリンと高グルコース刺激による *Rev-erba* および *Bmal1* の周期的変動が促進された。

ラメルテオンはリン酸化 CREB レベルを持続的に低下させてが、その低下の程度（約 10%）は小さかった（Fig. 11B）。その原因として、使用した INS-1 細胞のメラトニン受容体の発現量が低いことや、本試験の条件（低い血清濃度、フォルスコリン刺激なし）ではアデニル酸シクラーゼの活性が低いためと推定される。事実、第 2 章の Fig. 9C で記載したようにフォルスコリン誘発リン酸化 CREB の増加に対して、ラメルテオンは最大 40%程度減少させた。ヒト MT_1 受容体発現 CHO 細胞とは異なり、INS-1 細胞におけるラメルテオン誘発 sensitization は、ラメルテオン除去および洗浄直後から観察された（Fig. 11C）。これはラメルテオンのラット MT_1 受容体に対する親和性が、ヒト型とは異なり、メラトニンと同等以下であるため（第 2 章 Table 8 参照）、受容体解離速度が速く、速やかに sensitization が生じたのであろう。ラメルテオンはメラトニンの既知報告と同様、前処置時間および濃度に依存した cAMP シグナルの sensitization を引き起こしたが、その作用はかなり広い処置時間（2–14 時間）、濃度範囲（0.1–100 nM）にわたって比例することが分かった。sensitization の機序は明らかになっていないが、ラメルテオンとフォルスコリン、もしくはルジンドールとの同時処置試験から、メラトニン受容体の下流である cAMP 経路を介して、ラメルテオンによる sensitization が生じていることが示唆された（Fig. 12A）。INS-1 細胞における MT_1 受容体のノックダウンはメラトニン誘発 sensitization を消失させるとの報告から、本試験におけるラメルテオンの sensitization も MT_1 受容体を介していると考えられる [67]。また、PKA 阻害剤、アデニル酸シクラーゼ阻害剤を用いた試験結果から、PKA もしくはその下流分子がラメルテオンの sensitization に関与していると推測される（Fig. 12B）。ただし、ラメルテオンは高濃度（100 nM）においても cAMP シグナルを持続的に抑制したことから、 κ -opioid 受容体を介した sensitization とは異なり、受容体の脱感作は関与しないであろう [89]。

INS-1 細胞において、ラメルテオンは今回選択した 7 つの時計遺伝子群のうち、特定の mRNA 発現にのみ、処置時間に依存した発現変動を誘導した。*Per1*、*Per2* の発現はラメルテオン処置 2 時間後に顕著に低下するが、14 時間処置後には *Per1* の発現はコントロール群のレベルまで回復し、*Per2* の発現はやや増加した。*Per1*、*Per2* の転写は CREB によって活性化されることから、ラメルテオンのリン酸化 CREB 低下作用によって、*Per1*、*Per2* の発現は処置 2 時間後に低下したと考えられる [81]。14 時間処置の間、リン酸化 CREB のレベルは持続的に低下していたことを考慮すると、8 時間処置の間に CREB に対して拮抗作用を示す inducible cAMP early repressor が誘導され、*Per1*、*Per2* の発現抑制を阻害したと推測される [90]。さらに、*Rev-erba*、*Bmal1* の発現は 2 時間と 14 時間処置群の間で明確に異なった。興味深いことに、*Rev-erba* の発現は処置時間に比例して増加した。メラトニンは下垂体隆起部の *Rev-erba* 発現を急激に変動させず、その位相を調節する

ことが報告されているが、処置時間依存的な *Rev-erba* の発現変動を考慮すると、このような現象を説明できるかもしれない [91]。*Rev-erba* の転写は *Clock/Bmal1* による活性化と *Per/Cry* によるトランス抑制によって制御され、その結果 *Rev-erba* の概日振動が生じる [69]。本研究では、*Bmal1* の発現が低下し、*Clock* の発現は変化しなかったことから、*Clock/Bmal1* 複合体は増加していないと推測される。そのため、ラメルテオンによる *Rev-erba* 発現制御の機序は不明であるが、フォルスコリン単独、ラメルテオンとフォルスコリンもしくはルジンドールとの同時処置試験から、メラトニン受容体の下流にある cAMP シグナル経路の関与が示唆されている (Fig. 14, 17)。今後、cAMP シグナルがどのように *Rev-erba* を抑制するか明らかにしていく必要がある。

これまでの複数の報告から、メラトニンによる *Rev-erba* の周期的発現変動への作用が知られている [77, 91, 92]。メラトニンの産生、分泌組織である松果体除去を除去すると、ラット下垂体隆起部における *Rev-erba* の周期的発現が消失する [77]。ただし、SCN においては *Rev-erba* の周期的発現が変化しない。また、このような下垂体隆起部における変化はメラトニンの飲水投与によって部分的に回復する。一方、メラトニン受容体ノックアウトマウスの研究から、*MT₁* もしくは *MT₂* 受容体の欠失により、膵臓における *Rev-erba* 発現が増加し、*MT₁* 受容体欠失ではさらにその位相も前進することが分かっている [93]。これらのことから、メラトニンシグナルの *Rev-erba* の概日発現に対する作用は、各組織によって大きく異なることが示唆されている。メラトニンは *in vitro* において細胞種によって異なる時計遺伝子発現変動を誘導するが、これが組織依存性を生むのかもしれない [71]。本研究で用いた INS-1 細胞においては、ラメルテオンを長時間前処置することにより、フォルスコリン、高グルコース刺激で誘発される *Rev-erba*、*Bmal1* の周期的発現の振幅が増幅された (Fig. 18)。一方、*Per1* の発現は急速かつ一過性に増加した。血清刺激と同様にフォルスコリン刺激は、個々の細胞における時計遺伝子発現を同調させることによって、時計遺伝子の周期的発現を増幅する [82, 88]。ラメルテオンによる cAMP シグナルの sensitization は、このような同調作用に寄与し、*Rev-erba*、*Bmal1* の周期的発現の振幅を増幅した可能性がある。また、前述した下垂体隆起部と同様、ラメルテオン前処置による *Per1* の発現増加も sensitization が起因しているかもしれない [59]。加えて、*Per1/Per2* 変異マウスでは *Rev-erba* の概日発現が減弱していることから、*Per1* の一過的発現誘導が *Rev-erba* の周期的発現に影響していることも考えられる [83]。

Rev-erba は各組織において概日発現する重要な代謝調節因子であり、概日シグナルを代謝、炎症制御反応に、またその逆方向にシグナルを変換する分子である [69]。Vieira らは膵島や MIN-6 細胞において、siRNA によって *Rev-erba* 発現を低下させることにより、グルコース誘発インスリン分泌や細胞増殖などの β 細胞機能が障害されることを報告している [85]。よって、ラメルテオンによる *Rev-erba* 発現誘導は β 細胞機能を亢進すると推定される。このような仮定と一致して、ラメルテオンは *Rev-erba* 作動薬によるインスリン分泌を促進し、*Rev-erba* の下流遺伝子として報告されている *Bmal1*、*PGC-1 α* 、*Srebp-1c*、*FAS* 発現を低下させた (Fig. 15, 16)。*Rev-erba* による *Srebp-1c*、*FAS* 発現制御は間接的であるため、ラメルテオンによるこれら遺伝子への作用が *Bmal1* や *PGC-1 α* に比べて小さかったと推測される。興味深いことに下垂体隆起部では、メラトニンはその作用持続時間の情報を *Cry1* の急激な発現誘導と sensitization による *Per1* 発現誘導によって変換し、甲状腺刺激ホルモンの発現を制御することが提唱されている [75]。同様に *Rev-erba*

はメラトニンシグナルの作用持続時間の情報を β 細胞機能に変換するのかもしれない。

メラトニンの反応性が INS-1 細胞と膵島で類似しているという知見（フォルスコリンに対する sensitization やインスリン分泌作用など）に基づき、本研究では内在性 MT_1 受容体を発現する膵島のモデルとして INS-1 細胞を使用した。しかしながら、時計遺伝子発現制御については両細胞間で異なっている可能性がある。事実、INS-1 細胞における各時計遺伝子の相対的発現量はげっ歯類の膵島とは異なっていた。INS-1 細胞では Per1、Clock の発現が最も高かった（データ未掲載）のに対し、マウス膵島では Rev-erba、Clock の高発現が報告されている [85]。そのため、膵島において、ラメルテオンによる時計遺伝子の変動をさらに検討する必要がある。

以上から、INS-1 細胞におけるメラトニンシグナルの作用持続時間は、cAMP シグナルが関与する時計遺伝子発現やインスリン分泌に影響を与えることが示唆された。

【総括】

本研究において、著者はラメルテオンとそのヒト主代謝物 M-II のメラトニン受容体に対する作用を検討した後、MT₁ 受容体における各作動薬の作用持続時間の違いを明らかにした。さらに内在性 MT₁ 受容体を発現する INS-1 細胞において、持続的なメラトニン受容体刺激およびその除去に伴う細胞内シグナルの変化を検討した。これらの検討結果から、以下の知見が得られた。

1. ラメルテオンと M-II はヒト MT₁、MT₂ 受容体に対して高い親和性および作動活性を持ち、他のメラトニン結合部位 (Quinone reductase 2) や各種受容体、酵素などに対してはほとんど作用しなかった。また、M-II はラメルテオン同様、ネコにおいて睡眠促進作用を示した。すなわち、ラメルテオンと M-II は MT₁/MT₂ 受容体選択的作動薬であり、M-II の作動活性はラメルテオンより低い、メラトニン受容体作動薬としてラメルテオンの薬効に一部寄与していることが示唆された。
2. ヒト MT₁ 受容体発現 CHO 細胞において、ラメルテオンは 2 時間処置後に除去しても持続的な作動活性を示したが、M-II の作動活性は速やかに消失した。また、作動薬除去後の残存活性と脱感作の程度および脂溶性とは相関しなかったが、受容体解離速度とは強い相関性が見られた。つまり、ラメルテオンと M-II は細胞レベルにおいて異なる作用持続時間を持ち、受容体解離速度がラメルテオンの作用持続性に関与していることを示している。
3. 内在性 MT₁ 受容体を発現するラット膵β細胞株 INS-1 細胞において、ラメルテオンは長時間処置している間、リン酸化 CREB やインスリン分泌などの cAMP シグナルを持続的に抑制し、処置時間依存的に時計遺伝子の発現を変動させた。ラメルテオン除去後、処置時間の長さに応じて cAMP シグナルの sensitization が生じ、インスリン分泌および Rev-erba、Bmal1 の周期的発現変動が促進された。つまり、INS-1 細胞におけるメラトニンシグナルの作用持続時間は、処置中のみならず、処置後においてもβ細胞機能に大きな影響を及ぼす因子であることが示唆された。

以上の結果から、ラメルテオンはその遅い受容体解離速度により、M-II は長く高い血中濃度により、共に MT₁ 受容体に対して持続的な作用を発揮する可能性が示された。また、このような持続的な作用は薬剤処置中だけでなく、薬剤除去後の細胞内シグナルにも影響しうることが示唆された。これらの作用持続性に関する知見は、*in vivo* におけるラメルテオンの薬効の理解や 2 型糖尿病などの新たな適応症を検討するうえで有益である。

【引用文献】

1. Dijk D J and Cajochen C: Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG. *J Biol Rhythms*. **12**, 627-635 (1997).
2. Redman J, Armstrong S, and Ng K T: Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science*. **219**, 1089-1091 (1983).
3. Reiter R J: The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev*. **1**, 109-131 (1980).
4. Tzischinsky O, Shlitner A, and Lavie P: The association between the nocturnal sleep gate and nocturnal onset of urinary 6-sulfatoxymelatonin. *J Biol Rhythms*. **8**, 199-209 (1993).
5. Zhdanova I V, Wurtman R J, Lynch H J, Ives J R, Dollins A B, Morabito C, Matheson J K, and Schomer D L: Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin Pharmacol Ther*. **57**, 552-558 (1995).
6. Lockley S W, Dressman M A, Licamele L, Xiao C, Fisher D M, Flynn-Evans E E, Hull J T, Torres R, Lavedan C, and Polymeropoulos M H: Tasimelteon for non-24-hour sleep-wake disorder in totally blind people (SET and RESET): two multicentre, randomised, double-masked, placebo-controlled phase 3 trials. *Lancet*. **386**, 1754-1764 (2015).
7. Kennedy S H and Emsley R: Placebo-controlled trial of agomelatine in the treatment of major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. **16**, 93-100 (2006).
8. Erman M, Seiden D, Zammit G, Sainati S, and Zhang J: An efficacy, safety, and dose-response study of Ramelteon in patients with chronic primary insomnia. *Sleep Med*. **7**, 17-24 (2006).
9. Reppert S M, Weaver D R, and Ebisawa T: Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. **13**, 1177-1185 (1994).
10. Reppert S M, Godson C, Mahle C D, Weaver D R, Slaugenhaupt S A, and Gusella J F: 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 (1995).
11. Witt-Enderby P A, MacKenzie R S, McKeon R M, Carroll E A, Bordt S L, and Melan M A: Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cell Motil Cytoskeleton*. **46**, 28-42 (2000).
12. Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Strosberg A D, and Jockers R: Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol*. **58**, 633-639 (1999).
13. McArthur A J, Hunt A E, and Gillette M U: Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology*. **138**, 627-634 (1997).
14. Liu C, Weaver D R, Jin X, Shearman L P, Pieschl R L, Gribkoff V K, and Reppert S M: Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*. **19**, 91-102 (1997).

15. Dubocovich M L, Yun K, Al-Ghoul W M, Benloucif S, and Masana M I: Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J.* **12**, 1211-1220 (1998).
16. Scher J, Wankiewicz E, Brown G M, and Fujieda H: MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **43**, 889-897 (2002).
17. Ramracheya R D, Muller D S, Squires P E, Brereton H, Sugden D, Huang G C, Amiel S A, Jones P M, and Persaud S J: Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res.* **44**, 273-279 (2008).
18. Yukuhiro N, Kimura H, Nishikawa H, Ohkawa S, Yoshikubo S, and Miyamoto M: Effects of ramelteon (TAK-375) on nocturnal sleep in freely moving monkeys. *Brain Res.* **1027**, 59-66 (2004).
19. Zammit G, Erman M, Wang-Weigand S, Sainati S, Zhang J, and Roth T: Evaluation of the efficacy and safety of ramelteon in subjects with chronic insomnia. *J Clin Sleep Med.* **3**, 495-504 (2007).
20. Richardson G S, Zammit G, Wang-Weigand S, and Zhang J: Safety and subjective sleep effects of ramelteon administration in adults and older adults with chronic primary insomnia: a 1-year, open-label study. *J Clin Psychiatry.* **70**, 467-476 (2009).
21. van Geijlswijk I M, Korzilius H P, and Smits M G: The use of exogenous melatonin in delayed sleep phase disorder: a meta-analysis. *Sleep.* **33**, 1605-1614 (2010).
22. Fourtillan J B, Brisson A M, Gobin P, Ingrand I, Decourt J P, and Girault J: Bioavailability of melatonin in humans after day-time administration of D(7) melatonin. *Biopharm Drug Dispos.* **21**, 15-22 (2000).
23. Ferracioli-Oda E, Qawasmi A, and Bloch M H: Meta-analysis: melatonin for the treatment of primary sleep disorders. *PLoS One.* **8**, e63773 (2013).
24. Karim A, Tolbert D, and Cao C: Disposition kinetics and tolerance of escalating single doses of ramelteon, a high-affinity MT1 and MT2 melatonin receptor agonist indicated for treatment of insomnia. *J Clin Pharmacol.* **46**, 140-148 (2006).
25. Vauquelin G and Charlton S J: Long-lasting target binding and rebinding as mechanisms to prolong in vivo drug action. *Br J Pharmacol.* **161**, 488-508 (2010).
26. Copeland R A, Pompliano D L, and Meek T D: Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov.* **5**, 730-739 (2006).
27. Miyamoto M, Nishikawa H, Doken Y, Hirai K, Uchikawa O, and Ohkawa S: The sleep-promoting action of ramelteon (TAK-375) in freely moving cats. *Sleep.* **27**, 1319-1325 (2004).
28. Lancel M: Role of GABAA receptors in the regulation of sleep: initial sleep responses to peripherally administered modulators and agonists. *Sleep.* **22**, 33-42 (1999).
29. Hirai K, Kita M, Ohta H, Nishikawa H, Fujiwara Y, Ohkawa S, and Miyamoto M: Ramelteon (TAK-375) accelerates reentrainment of circadian rhythm after a phase advance of the light-dark cycle in rats. *J Biol Rhythms.* **20**, 27-37 (2005).
30. Audinot V, Bonnaud A, Grandcolas L, Rodriguez M, Nagel N, Galizzi J P, Balik A, Messenger S, Hazlerigg D G, Barrett P, Delagrangre P, and Boutin J A: Molecular cloning and pharmacological

- characterization of rat melatonin MT1 and MT2 receptors. *Biochem Pharmacol.* **75**, 2007-2019 (2008).
31. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin J M, Lefoulon F, Fauchere J L, Delagrance P, Canet E, and Boutin J A: Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* **275**, 31311-31317 (2000).
 32. Boutin J A: Quinone reductase 2 as a promising target of melatonin therapeutic actions. *Expert Opin Ther Targets.* 1-15 (2015).
 33. Niles L P, Pickering D S, and Sayer B G: HPLC-purified 2-[125I]iodomelatonin labels multiple binding sites in hamster brain. *Biochem Biophys Res Commun.* **147**, 949-956 (1987).
 34. Legros C, Devavry S, Caignard S, Tessier C, Delagrance P, Ouvry C, Boutin J A, and Nosjean O: Melatonin MT(1) and MT(2) receptors display different molecular pharmacologies only in the G-protein coupled state. *Br J Pharmacol.* **171**, 186-201 (2014).
 35. Nonno R, Lucini V, Pannacci M, Mazzucchelli C, Angeloni D, Fraschini F, and Stankov B M: Pharmacological characterization of the human melatonin Mel1a receptor following stable transfection into NIH3T3 cells. *Br J Pharmacol.* **124**, 485-492 (1998).
 36. Miyamoto M: Effect of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist, on motor performance in mice. *Neurosci Lett.* **402**, 201-204 (2006).
 37. Weaver D R, Stehle J H, Stopa E G, and Reppert S M: Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. *J Clin Endocrinol Metab.* **76**, 295-301 (1993).
 38. Laitinen J T and Saavedra J M: Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. *Endocrinology.* **126**, 2110-2115 (1990).
 39. Battram C, Charlton S J, Cuenoud B, Dowling M R, Fairhurst R A, Farr D, Fozard J R, Leighton-Davies J R, Lewis C A, McEvoy L, Turner R J, and Trifilieff A: In vitro and in vivo pharmacological characterization of 5-[(R)-2-(5,6-diethyl-indan-2-ylamino)-1-hydroxy-ethyl]-8-hydroxy-1H-quinolin-2-one (indacaterol), a novel inhaled beta(2) adrenoceptor agonist with a 24-h duration of action. *J Pharmacol Exp Ther.* **317**, 762-770 (2006).
 40. Waldeck B: Beta-adrenoceptor agonists and asthma--100 years of development. *Eur J Pharmacol.* **445**, 1-12 (2002).
 41. Baur F, Beattie D, Beer D, Bentley D, Bradley M, Bruce I, Charlton S J, Cuenoud B, Ernst R, Fairhurst R A, Faller B, Farr D, Keller T, Fozard J R, Fullerton J, Garman S, Hatto J, Hayden C, He H, Howes C, Janus D, Jiang Z, Lewis C, Loeuillet-Ritzler F, Moser H, Reilly J, Steward A, Sykes D, Tedaldi L, Trifilieff A, Tweed M, Watson S, Wissler E, and Wyss D: The identification of indacaterol as an ultralong-acting inhaled beta2-adrenoceptor agonist. *J Med Chem.* **53**, 3675-3684 (2010).
 42. Coleman R A, Johnson M, Nials A T, and Vardey C J: Exosites: their current status, and their relevance to the duration of action of long-acting beta 2-adrenoceptor agonists. *Trends Pharmacol Sci.* **17**, 324-330 (1996).

43. Deyrup M D, Nowicki S T, Richards N G, Otero D H, Harrison J K, and Baker S P: Structure-affinity profile of 8-hydroxycarbostryl-based agonists that dissociate slowly from the beta2-adrenoceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **359**, 168-177 (1999).
44. Szczuka A, Wennerberg M, Packeu A, and Vauquelin G: Molecular mechanisms for the persistent bronchodilatory effect of the beta 2-adrenoceptor agonist salmeterol. *Br J Pharmacol.* **158**, 183-194 (2009).
45. Lindstrom E, von Mentzer B, Pahlman I, Ahlstedt I, Uvebrant A, Kristensson E, Martinsson R, Noven A, de Verdier J, and Vauquelin G: Neurokinin 1 receptor antagonists: correlation between in vitro receptor interaction and in vivo efficacy. *J Pharmacol Exp Ther.* **322**, 1286-1293 (2007).
46. Zorrilla E P, Heilig M, de Wit H, and Shaham Y: Behavioral, biological, and chemical perspectives on targeting CRF(1) receptor antagonists to treat alcoholism. *Drug Alcohol Depend.* **128**, 175-186 (2013).
47. Gerdin M J, Masana M I, Ren D, Miller R J, and Dubocovich M L: 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 (2003).
48. Gerdin M J, Masana M I, Rivera-Bermudez M A, Hudson R L, Earnest D J, Gillette M U, and Dubocovich M L: 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 (2004).
49. Ying S W, Rusak B, and Mocaer E: Chronic exposure to melatonin receptor agonists does not alter their effects on suprachiasmatic nucleus neurons. *Eur J Pharmacol.* **342**, 29-37 (1998).
50. Gerdin M J, Masana M I, and Dubocovich M L: Melatonin-mediated regulation of human MT(1) melatonin receptors expressed in mammalian cells. *Biochem Pharmacol.* **67**, 2023-2030 (2004).
51. MacKenzie R S, Melan M A, Passey D K, and Witt-Enderby P A: Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol.* **63**, 587-595 (2002).
52. Witt-Enderby P A and Dubocovich M L: Characterization and regulation of the human ML1A melatonin receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol.* **50**, 166-174 (1996).
53. Malany S, Hernandez L M, Smith W F, Crowe P D, and Hoare S R: Analytical method for simultaneously measuring ex vivo drug receptor occupancy and dissociation rate: application to (R)-dimethindene occupancy of central histamine H1 receptors. *J Recept Signal Transduct Res.* **29**, 84-93 (2009).
54. Nials A T, Ball D I, Butchers P R, Coleman R A, Humbles A A, Johnson M, and Vardey C J: Formoterol on airway smooth muscle and human lung mast cells: a comparison with salbutamol and salmeterol. *Eur J Pharmacol.* **251**, 127-135 (1994).
55. Summerhill S, Stroud T, Nagendra R, Perros-Huguet C, and Trevethick M: A cell-based assay to assess the persistence of action of agonists acting at recombinant human beta(2) adrenoceptors. *J Pharmacol Toxicol Methods.* **58**, 189-197 (2008).

56. Watts V J and Neve K A: Sensitization of adenylate cyclase by Galpha i/o-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* **106**, 405-421 (2005).
57. Witt-Enderby P A, Masana M I, and Dubocovich M L: Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology.* **139**, 3064-3071 (1998).
58. Kemp D M, Ubeda M, and Habener J F: Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. *Mol Cell Endocrinol.* **191**, 157-166 (2002).
59. von Gall C, Garabette M L, Kell C A, Frenzel S, Dehghani F, Schumm-Draeger P M, Weaver D R, Korf H W, Hastings M H, and Stehle J H: Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci.* **5**, 234-238 (2002).
60. Browning C, Beresford I, Fraser N, and Giles H: Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors. *Br J Pharmacol.* **129**, 877-886 (2000).
61. Motulsky H J and Mahan L C: The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action. *Mol Pharmacol.* **25**, 1-9 (1984).
62. Rasmussen D D, Boldt B M, Wilkinson C W, Yellon S M, and Matsumoto A M: Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology.* **140**, 1009-1012 (1999).
63. Agil A, Rosado I, Ruiz R, Figueroa A, Zen N, and Fernandez-Vazquez G: Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res.* **52**, 203-210 (2012).
64. Garfinkel D, Zorin M, Wainstein J, Matas Z, Laudon M, and Zisapel N: Efficacy and safety of prolonged-release melatonin in insomnia patients with diabetes: a randomized, double-blind, crossover study. *Diabetes Metab Syndr Obes.* **4**, 307-313 (2011).
65. McMullan C J, Schernhammer E S, Rimm E B, Hu F B, and Forman J P: Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes. *JAMA.* **309**, 1388-1396 (2013).
66. Picinato M C, Haber E P, Cipolla-Neto J, Curi R, de Oliveira Carvalho C R, and Carpinelli A R: Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pineal Res.* **33**, 156-160 (2002).
67. Muhlbauer E, Albrecht E, Bazwinsky-Wutschke I, and Peschke E: Melatonin influences insulin secretion primarily via MT(1) receptors in rat insulinoma cells (INS-1) and mouse pancreatic islets. *J Pineal Res.* **52**, 446-459 (2012).
68. Takahashi J S, Hong H K, Ko C H, and McDearmon E L: The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet.* **9**, 764-775 (2008).
69. Bass J and Takahashi J S: Circadian integration of metabolism and energetics. *Science.* **330**, 1349-1354 (2010).
70. Marcheva B, Ramsey K M, Buhr E D, Kobayashi Y, Su H, Ko C H, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna M H, Lopez J P, Philipson L H, Bradfield C A, Crosby S D, JeBailey L, Wang X, Takahashi J

- S, and Bass J: Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. **466**, 627-631 (2010).
71. Hardeland R, Madrid J A, Tan D X, and Reiter R J: Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res*. **52**, 139-166 (2012).
 72. Imbesi M, Arslan A D, Yildiz S, Sharma R, Gavin D, Tun N, Manev H, and Uz T: The melatonin receptor MT1 is required for the differential regulatory actions of melatonin on neuronal 'clock' gene expression in striatal neurons in vitro. *J Pineal Res*. **46**, 87-94 (2009).
 73. Xiang S, Mao L, Duplessis T, Yuan L, Dauchy R, Dauchy E, Blask D E, Frasch T, and Hill S M: Oscillation of clock and clock controlled genes induced by serum shock in human breast epithelial and breast cancer cells: regulation by melatonin. *Breast Cancer (Auckl)*. **6**, 137-150 (2012).
 74. Alonso-Vale M I, Andreotti S, Mukai P Y, Borges-Silva C, Peres S B, Cipolla-Neto J, and Lima F B: Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *J Pineal Res*. **45**, 422-429 (2008).
 75. Barrett P and Bolborea M: Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. *J Pineal Res*. **52**, 376-388 (2012).
 76. von Gall C, Weaver D R, Moek J, Jilg A, Stehle J H, and Korf H W: Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann N Y Acad Sci*. **1040**, 508-511 (2005).
 77. Agez L, Laurent V, Guerrero H Y, Pevet P, Masson-Pevet M, and Gauer F: Endogenous melatonin provides an effective circadian message to both the suprachiasmatic nuclei and the pars tuberalis of the rat. *J Pineal Res*. **46**, 95-105 (2009).
 78. Muhlbauer E and Peschke E: Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and beta-cell. *J Pineal Res*. **42**, 105-106 (2007).
 79. Bazwinsky-Wutschke I, Wolgast S, Muhlbauer E, Albrecht E, and Peschke E: Phosphorylation of cyclic AMP-response element-binding protein (CREB) is influenced by melatonin treatment in pancreatic rat insulinoma beta-cells (INS-1). *J Pineal Res*. **53**, 344-357 (2012).
 80. Peschke E, Muhlbauer E, Musshoff U, Csernus V J, Chankiewicz E, and Peschke D: Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res*. **33**, 63-71 (2002).
 81. Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert S M, and Sassone-Corsi P: Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 7728-7733 (2002).
 82. Yagita K and Okamura H: Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett*. **465**, 79-82 (2000).
 83. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, and Schibler U: The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. **110**, 251-260 (2002).

84. Solt L A, Wang Y, Banerjee S, Hughes T, Kojetin D J, Lundasen T, Shin Y, Liu J, Cameron M D, Noel R, Yoo S H, Takahashi J S, Butler A A, Kamenecka T M, and Burris T P: Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature*. **485**, 62-68 (2012).
85. Vieira E, Marroqui L, Batista T M, Caballero-Garrido E, Carneiro E M, Boschero A C, Nadal A, and Quesada I: The clock gene Rev-erbalpha regulates pancreatic beta-cell function: modulation by leptin and high-fat diet. *Endocrinology*. **153**, 592-601 (2012).
86. Vieira E, Marroqui L, Figueroa A L, Merino B, Fernandez-Ruiz R, Nadal A, Burris T P, Gomis R, and Quesada I: Involvement of the clock gene Rev-erb alpha in the regulation of glucagon secretion in pancreatic alpha-cells. *PLoS One*. **8**, e69939 (2013).
87. Wu N, Yin L, Hanniman E A, Joshi S, and Lazar M A: Negative feedback maintenance of heme homeostasis by its receptor, Rev-erbalpha. *Genes Dev*. **23**, 2201-2209 (2009).
88. Balsalobre A, Marcacci L, and Schibler U: Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr Biol*. **10**, 1291-1294 (2000).
89. Li J G, Zhang F, Jin X L, and Liu-Chen L Y: Differential regulation of the human kappa opioid receptor by agonists: etorphine and levorphanol reduced dynorphin A- and U50,488H-induced internalization and phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther*. **305**, 531-540 (2003).
90. Schwartz W J, Aronin N, and Sassone-Corsi P: Photoinducible and rhythmic ICER-CREM immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*. **385**, 87-91 (2005).
91. Wagner G C, Johnston J D, Tournier B B, Ebling F J, and Hazlerigg D G: Melatonin induces gene-specific effects on rhythmic mRNA expression in the pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur J Neurosci*. **25**, 485-490 (2007).
92. Agez L, Laurent V, Pevet P, Masson-Pevet M, and Gauer F: Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience*. **144**, 522-530 (2007).
93. Muhlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S, and Peschke E: Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol*. **606**, 61-71 (2009).

【謝辞】

本論文の作成にご指導、ご鞭撻を賜りました京都薬科大学大学院薬学研究科 病態薬科学系薬物治療学分野 加藤 伸一教授、病態薬科学系病態生化学分野 秋葉 聡教授、病態薬科学系薬理学分野 大矢 進教授に謹んで感謝致します。

本研究を進めるにあたり、また本論文の作成においてご指導頂きました武田薬品工業株式会社 CNS-DDU 所長 平井 圭介博士に深く感謝致します。