

氏名 (生年月日) <sup>にし やま けい じ</sup> 西 山 啓 次 (1977年1月24日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 論博 第203号

学位授与の日付 2016年9月30日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 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 MT<sub>1</sub> 受容体シグナルの変化

論文審査委員 (主査) 教授 加藤 伸一

(副査) 教授 秋葉 聡

(副査) 教授 大矢 進

## 論文内容の要旨

メラトニンは主に夜間、松果体から分泌されるホルモンであり、視交叉上核に高発現しているメラトニン MT<sub>1</sub> および MT<sub>2</sub> 受容体を介して、睡眠覚醒サイクルなどの概日リズムを調節する。このような機序に基づき、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た。その睡眠誘発作用には、比較的血中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すると考えられている。一方、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し、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、薬剤の受容体への作用時間は、薬物動態だけでなく、受容体や細胞膜との結合様式にも依存する。しかしながら、薬効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。

本研究では、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明らかにし、さらにヒト MT<sub>1</sub> 受容体発現 CHO 細胞において、作用持続性と受容体解離速度との関係を検討した。またラメルテオンの2型糖尿病治療薬としての可能性を検討するため、内在性 MT<sub>1</sub> 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。

### 1. 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

受容体結合試験において、ヒト MT<sub>1</sub> 受容体に対しラメルテオンはメラトニンの約6倍、ヒト MT<sub>2</sub> 受容体に対し約3倍の高い親和性を有した。主薬効評価動物であるサルの視交叉上核を用いた受容体結合試験においても、ラメルテオンはメラトニンよりも高い親和性を示した。受容体機能試験において、ラメルテオンはヒト MT<sub>1</sub> および MT<sub>2</sub> 受容体発現 CHO 細胞におけるフォルスコリン誘発 cAMP 産生を抑制し、その作動活性はメラトニンより約4倍および17倍高かった。受容体選択性試験において、ラメルテオンはメラトニンとは異なり、メラトニン結合部位 MT<sub>3</sub> (Quinone reductase 2) に対して親和性を示さず、各種受容体、イオンチャネルおよび酵素に対しても結合もしくは活性阻害を示さなかった。同様の試験系において、M-II はヒト MT<sub>1</sub> および MT<sub>2</sub> 受容体へ選択的に結合し、完全作動薬として作用したが、その作動活性はメラトニンよりそれぞれ約4倍および2倍弱かった。さらにネコ睡眠脳波測定試験において、M-II は 0.01 mg/kg の

用量から、ラメルテオンと同様に睡眠促進作用を示した。以上より、ラメルテオンはメラトニンより高活性の  $MT_1/MT_2$  受容体選択的作動薬であり、そのヒト主代謝物 **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薬効に一部寄与している可能性が示された。

## 2. 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

メラトニンによる  $MT_2$  受容体の脱感作は  $MT_1$  受容体に比べて非常に顕著であるとの報告から、本研究では  $MT_1$  受容体においてのみ、ラメルテオンおよび **M-II** の作用持続性を検討した。ヒト  $MT_1$  受容体発現 CHO 細胞において、各作動薬（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 2 時間前処置した後、洗浄除去してから残存する作動活性（フォルスコリン誘発 cAMP 産生抑制作用およびリン酸化 ERK 増加作用）を測定した。ラメルテオンおよび 2-ヨードメラトニンは、薬剤除去後も持続的な作動活性を示したが、**M-II** およびメラトニンの活性は速やかに消失した。むしろ **M-II** およびメラトニンは薬剤除去に伴い、未処置群に比べてフォルスコリン誘発 cAMP 産生を増加させた。この現象は *sensitization* と呼ばれ、Gi 共役型 GPCR への長時間リガンド刺激およびその除去に伴って、代償的にアデニル酸シクラーゼの活性が上昇する現象である。このような作動薬によって異なる反応の機序を調べるため、作動薬による受容体の脱感作、作動薬の受容体からの解離速度、および作動薬の脂溶性を調べた。その結果、作動薬除去後の残存活性（cAMP 産生量およびリン酸化 ERK 量）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。すなわち、受容体解離速度の遅いラメルテオンは薬剤除去後も作用が持続したのに対し、受容体解離速度の速い **M-II** は速やかに作用が消失した。以上から、細胞レベルにおいて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。

## 3. ラット膵 $\beta$ 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

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。また、メラトニンが膵  $\beta$  細胞機能に対する直接作用を有することが報告されていることから、メラトニン受容体作動薬の 2 型糖尿病治療薬としての可能性が検討されている。持続的な  $MT_1$  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調べるため、内在性  $MT_1$  受容体を発現するラット膵  $\beta$  細胞株 INS-1 を用いて検討した。ラメルテオンは処置時間中（2-14 時間）、持続的にリン酸化 CREB 量およびインスリン分泌量を減少させた。一方、薬剤除去後にフォルスコリン刺激すると、前処置時間依存的にリン酸化 CREB 量およびインスリン分泌量を増加させた。この増加はメラトニン受容体拮抗薬ルジンドールの添加により阻害された。さらに糖代謝と関連する時計遺伝子群（*Rev-erba*、*Bmal1*、*Per1*、*Per2*）の mRNA 発現について検討した結果、ラメルテオンの処置時間に依存した発現変動を示した。すなわち *Per1* および *Per2* は発現減少後、回復したのに対し、*Rev-erba* および *Bmal1* はそれぞれ処置時間に伴って発現増加もしくは減少した。その中でも  $\beta$  細胞機能に重要な役割をもつ *Rev-erba* mRNA および蛋白質が長時間処置（14 時間）により顕著に発現増加し、その下流遺伝子 *PGC-1 $\alpha$*  の発現減少や *Rev-erba* 作動薬 GSK4112 によるインスリン分泌亢進が観察された。また、時計遺伝子の発現振動に対する前処置時間の影響を調べるため、ラメルテオン前処置およびその除去後、発現振動を誘発する高グルコースとフォルスコリンの同時刺激を行った。その結果、長時間前処置（14 時間）群は短時間前処置（2 時間）群に比べ、*Rev-erba* および *Bmal1* mRNA 発現振動の振幅が増大した。*Rev-erba* の発現低下は  $\beta$  細胞の機能異常をもたらすことから、長時間のラメルテオン処置は  $\beta$  細胞機能を亢進させる可能性がある。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インスリン分泌や時計遺伝子発現に影響を与えることが示唆された。

本研究結果から、ラメルテオンはその遅い受容体解離速度により、**M-II** は持続的な高い血中濃度により、共に **MT<sub>1</sub>** 受容体に対して作用持続性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。

## 論文審査の結果の要旨

メラトニン受容体作動薬であるラメルテオンは不眠症治療薬として現在臨床で使用されている。ラメルテオンの睡眠誘発作用には、比較的血中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に加えて、より半減期の長いヒト主代謝物 **M-II** もまた総睡眠時間の延長作用をもたらしている可能性がある。薬剤の作用時間は、薬物動態だけでなく、受容体や細胞膜との結合様式にも依存するが、ラメルテオンおよび **M-II** ともに作用持続性との関連については明らかになっていない。

本研究では、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明らかにし、さらに作用持続性と受容体乖離速度との関係を検討した。また、ラメルテオンによる処置時間依存的な糖代謝関連時計遺伝子発現の変動やインスリン分泌に対する効果についても検討した。

第一章では、ラメルテオンと **M-II** のメラトニン受容体に対する作用について検討した。ラメルテオンは **MT<sub>1</sub>** および **MT<sub>2</sub>** 受容体に対してメラトニンよりも高い親和性ならびに選択的な作動活性を示した。同様に、**M-II** も **MT<sub>1</sub>** および **MT<sub>2</sub>** 受容体に対して完全作動薬として作用したが、その作用はメラトニンよりも弱かった。以上より、ラメルテオンはメラトニンより高活性の **MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub>** 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薬効の一部寄与している可能性が示された。

第二章では、ラメルテオンおよび **M-II** の作用持続性と受容体乖離速度との関係について検討した。ラメルテオンは、薬剤除去後も持続的な作動活性を示したが、**M-II** およびメラトニンの活性は速やかに消失した。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、受容体乖離速度とは強い相関性が見られた。すなわち、受容体乖離速度の遅いラメルテオンは薬剤除去後も作用が持続したのに対し、受容体乖離速度の速い **M-II** は速やかに作用が消失した。以上から、細胞レベルにおいて受容体乖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。

第三章では、ラメルテオンの処置時間依存的な糖代謝関連時計遺伝子発現の変動およびインスリン分泌に対する効果について検討した。ラメルテオンはラット膵  $\beta$  細胞株 **INS-1** において、処置時間依存的にインスリン分泌を減少させ、一方薬剤除去後には前処置時間依存的にインスリン分泌を増加させた。また、*Per1* および *Per2* は発現減少後回復したのに対し、*Rev-erba* および *Bmall* はそれぞれ処置時間に伴って発現増加もしくは減少した。中でも *Rev-erba* mRNA および蛋白質が長時間処置により顕著に発現増加し、その下流遺伝子 *PGC-1 $\alpha$*  の発現減少や *Rev-erba* 作動薬によるインスリン分泌亢進が観察された。さらにラメルテオンの長時間前処置は *Rev-erba* および *Bmall* mRNA 発現振動の振幅が増大した。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、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。

これらの研究成果は、国際学術雑誌 5 編に発表されており、ラメルテオンはその遅い受容体乖離速度により、**M-II** は持続的な高い血中濃度により、**MT<sub>1</sub>** 受容体に対して作用持続性を発揮する可能性が示された。これら作用持続性に関する知見は、ラメルテオンの薬効の理解に加えて、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。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。