日薬理誌（*Folia Pharmacol. Jpn.*）**127**，190～195（2006）

治療薬シリーズ(1)　うつ病①

オーファンGPCRとうつ病

斎藤祐見子　Zhiwei Wang*　丸山　敬

要約：オーファンGタンパク質受容体（GPCR）のリガンド探索は新規生理活性物質の発見と新規創薬標的に直結すると考えられている．あるオーファンGPCRのリガンドが既知物質と判明した場合でも研究が飛躍的に進展する．受容体同定により，そのリガンドの既知あるいは未知の生理作用の薬理学的解明が進み，創薬開発を開始することができる．メラニン凝集ホルモン（MCH）とその受容体はそのケースかもしれない．MCHノックアウト（KO）マウスは「ヤセ」であるため，摂食中枢の下流に位置する分子として大きな注目を集めた．1999年にオーファンGPCRの利用によりMCHの受容体が同定され，そのアンタゴニスト開発・KOマウス行動解析が一気に進む．驚いたことにMCHアンタゴニストは摂食行動は勿論「うつ状態」動物モデルに対しても効果を持つことが報告された．オーファンGPCRのリガンドとして発見された他の神経ペプチドも今後の精神病治療にとって有用な標的候補となる可能性がある．

1.　はじめに

うつ病は先進国で最もありふれた精神医学的疾患の一つであり，全人口の約5-8%以上が少なくとも「うつ状態」と推定されている．うつ病の病態生理として，何らかの遺伝的要因を持つ者にストレス負荷が契機となって脳内モノアミン代謝不全が惹起されると考えられてきた．そのため現在処方されている抗うつ薬としてはセロトニン・ノルアドレナリンの再取り込み阻害薬やその拮抗薬が汎用されている．一方，ストレス防御反応として作動する視床下部—下垂体—副腎皮質（HPA軸）異常がうつ病では高率に存在し，血中コルチゾール濃度が高いことが知られている．現在，HPA軸に関わるCRFを始めとしてサブスタンスP，バソプレシンなどの神経ペプチド拮抗薬が新しい抗うつ薬の候補として注目を浴び始めている．これから説明するように，オーファンGタンパク質共役型受容体（G-protein-coupled receptor：GPCR）のリガンドとして同定された神経ペプチドが抗うつ薬の有望な標的となることも期待される．これらは今までの薬とは異なったカテゴリーの抗うつ薬であり，既存の抗うつ薬では対処しがたい症例にも有効なことが期待できる．本稿では最初にオーファンGPCRについて概説し，次にそのリガンド探索の方法，そして抗うつ薬の標的として今後有望視される神経ペプチド系について紹介する．

2.　オーファンGPCRとリガンド探索

細胞膜を7回貫通する構造のGPCRにリガンドが結合すると，そのシグナルはGタンパク質を介して細胞の内側へと伝達される．GPCRの膜貫通部位はαヘリックスを形成し，それぞれの分子間で比較的良く保存されているため分子生物学的手法を駆使することにより新しいGPCRの同定が容易である．1986年にはわずか2つだったGPCR（ロドプシン，β_2-アドレナージック受容体）は，1988年にはlow stringency hybridization法により更に2つ増える（D_2受容体，$5HT_{1A}$受容体）．以後degenerate PCR, EST（expressed sequence tag）を手法として取り入れることでその数は急速に増えていく．そして現在では，ヒトでは865個，マウスでは1318個のGPCRが存在することが判明し(1)，自然界に存在する大きなタンパク質ファミリーのうちのひとつを構成するまでに至った．ヒトでは

キーワード：Gタンパク質共役型受容体，神経ペプチド，メラニン凝集ホルモン
埼玉医科大学 薬理学教室（〒350-0492 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38）
e-mail: yumisait@saitama-med.ac.jp
原稿受領日：2005年12月13日，会誌編集員会依頼原稿
カリフォルニア大学アーバイン校薬理学教室（ Department of Pharmacology, University of California, Irvine）
Title: Finding a novel target for depression through the orphan receptor strategy
Author: Yumiko Saito, Zhiwei Wang*, Kei Maruyama

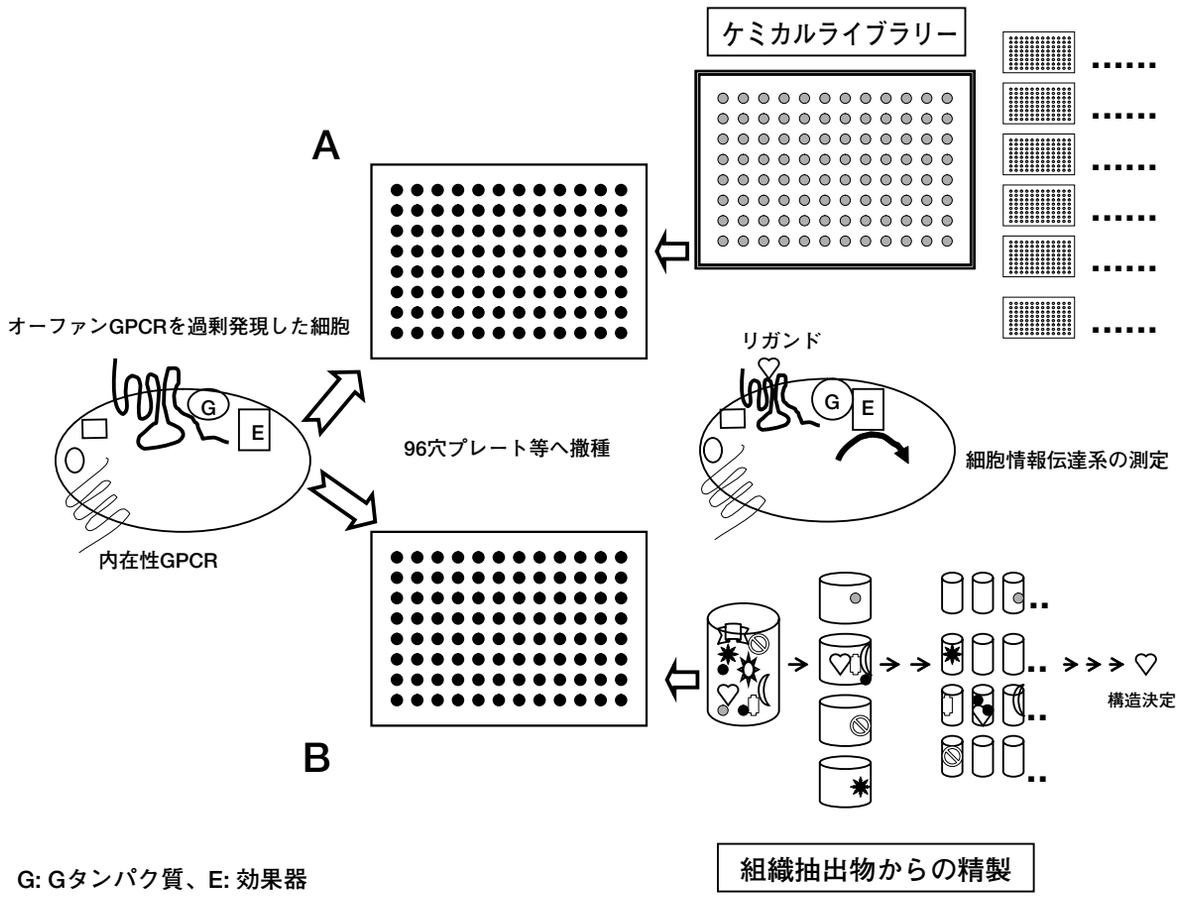

図1　オーファン GPCR を利用したリガンド探索（文献 5 より改変）
クローニングしたオーファン GPCR cDNA を導入した過剰発現細胞を用意する．この細胞に GPCR に対する内在性リガンドを含むと考えられる（A）ケミカルライブラリーまたは（B）組織抽出物のクロマトグラフィー分画を作用させる．その結果，受容体の活性化を経て細胞内情報伝達系が活性化する．ネガティブコントロールとして，トランスフェクションしていない細胞もしくは他のオーファン GPCR を過剰発現させた細胞を用い，活性化されたシグナルパターンを注意深く比較して非特異的応答を除外することが必要である．（B）のように組織抽出物を出発材料とする場合にはネガティブコントロール細胞との情報伝達シグナルの差をパラメーターとして，抽出物の精製を進めていくと理論上は最終的には内在性のリガンドが同定できる．

865 個の GPCR のうち，365 個が“non-chemosensory”受容体（嗅覚･味覚受容体ではない受容体）であり(2)，そのうちの約 160 程度は内因性リガンドが不明なため，オーファン（孤児）受容体と名づけられている(3)．オーファン GPCR の内在性リガンドを探し出すことは生理活性物質を発見することであり，新薬開発の新たな標的を探し出すことでもある．膜タンパク質は疾患の標的分子となる比率が他の分子種に比べて高く，この膜タンパク質のうちの多くが GPCR で占められているからである．実際に GPCR のアゴニスト・アンタゴニストは臨床の場で有効な実績を持つことが示されている．例えば 2000 年における全世界販売額上位 100 位までの医薬品にうち 26 個は GPCR を標的としており，その販売総額は 235 億ドルにもなる(4)．オーファン GPCR のリガンド探しは金鉱探しのようなものであり，研究者としての夢を満たすプロジェクトでもある．更にその努力の結果が社会に還元でき，マーケットにつながる可能性が高い研究である．そのため，1990 年代半ばから現在に至るまで欧米日本で激しい競争が繰り広げられている．その甲斐あってオーファン GPCR 研究抜きでは恐らく得ることができなかった画期的な成果が産まれている．

オーファン受容体の内在性リガンドを探索するための基本概念は逆薬理学“reverse pharmacology”または“オーファン受容体ストラテジー”と呼ばれる(3)．オーファン GPCR に対する内在性リガンドを得る方法は A）オーファン GPCR と既知分子とのマッチング B）組織抽出物を出発材料として精製・構造決定，の 2 つである（図 1）．これらの方法と併せてバイオインフォマティクスを活用したデータベースサーチが利用される場合もある．実際にはクローニングしたオーファン GPCR を適切な哺乳類培養細胞や酵母で過

剰発現させる．この細胞系に目的とするオーファン受容体の内在性リガンドを含むと考えられるケミカルライブラリーまたは組織抽出物を作用させ，リガンド結合による受容体の活性化を経て動員される情報伝達シグナルを測定する．当然ながらネガティブコントロールとして，トランスフェクションしていない細胞もしくは他のオーファン GPCR を過剰発現させた細胞を用いて，活性化されたシグナルパターンを比較し非特異的応答を除外することが必要である．

出発材料がライブラリーの場合，技術や経験はそれほど必要とせず，マッチングがヒットすれば，少なくともその受容体のアゴニストを同定したとは言える．しかし膨大なライブラリーと high throughput アッセイが必要なのでコストの負担が非常に大きい．加えてこの手法では想定外の結果が起こる場合がある(5)．例えば糖合成系に関与し，細胞外シグナルとしての機能は考えにくい UDP- グルコースは GPR105 とマッチングした．また GPR99 のリガンドとして AMP／アデノシンと α-ケトグルタレート（ketoglutarate）というまったく異なった化学的性質を持つ 2 つの分子が報告されている．この事実は in vitro でリガンドとして作用しても生体内においては内在性リガンドとして機能していない可能性を示唆する．従ってマッチングの結果には注意深い検証が必要であろう．一方，材料が生体組織抽出物である場合にはオーファン GPCR に対する生理リガンドが単離同定できると可能性が高い．しかし，何段階にも及ぶ精製が必要であり，精製途中に不活性化されることもあるし，構造決定が困難な場合もある．

マッチングと精製のどちらの方法を選択するにせよ，このオーファン受容体ストラテジーには始める前に考慮すべき点が 2 つある．1 つめは目的とするリガンドがどのような種類の物質か見当をつけておくことである．GPCR のリガンドはペプチドから光フォトンまで多岐に渡るのでどのような種類の合成ライブラリーを用意するか，最初の組織抽出はどの手法を取るべきか的を絞らないと先へは進めない．2 つめは，測定するべき細胞内情報伝達系である．目的とするオーファン GPCR がどのような G タンパク質や効果器に結合し，どのような種類の情報伝達系を活性化するのか予測することが必要である．

1995 年，組織抽出物を出発材料とすることにより，オーファン GPCR の初のリガンドとなる新規神経ペプチドノシセプチン／オルファニン FQ が 2 グループから同時に単離精製された(6, 7)．表 1 に組織抽出物からのリガンド同定例を示した．この分野において日本人の活躍は目覚しく，オレキシン(8, 9)，グレリン(10)，プロラクチン放出ペプチド(11) などの新規ペプチドが見出され，それぞれ徹底した生理機能の研究がなされている．一方，メラニン凝集ホルモン（MCH）やニューロメジン U（NMU）のように組織から精製したが既知物質ということもある．

3. メラニン凝集ホルモン系とうつ

1）MCH受容体の同定

MCH とうつの関連について記す前に，MCH の存在を一躍著明にした研究を紹介し，次にその受容体同定に至る過程を我々の経験を交えて概説する．

MCH は 20 年前にサケ脳下垂体から抽出された皮膚体色変化に関係する神経ペプチドである(12)．哺乳類でも MCH はラット脳から 19 個のペプチドとして単離され(13)，視床下部外則野の神経細胞体に局在し，MCH 陽性神経線維はペプチドニューロンとしては珍しく前脳から脊髄まで中枢神経系に広範囲に投射する(14)．MCH の示す生理作用の中で特に注目を集めたのは摂食との関係である．MCH は機能的レプチンが欠損した遺伝的肥満モデルマウス *ob/ob* において過剰発現している．さらに絶食により MCH mRNA 発現量は上昇し，MCH を脳内投与すると摂食行動が亢進することが判明した(15)．更に MCH ノックアウトマウスは摂食量が低下し，体重が減少する「ヤセ」形質を示した(16)．数ある摂食亢進性ペプチドの通常ノックアウトマウスで摂食低下，体重減少を呈したのは MCH ただ一つである．これは MCH 系がエネルギー代謝調節系において特異な位置を占めていることを示唆している．このように非常に注目された神経ペプチドであったが，その受容体が不明だったため，生化学的・薬理学的解析は当然不可能であった．

オーファン GPCR のひとつ，SLC-1 はソマトスタチン受容体と膜貫通部分で 40% のホモロジーを持つ(17)．ソマトスタチン受容体は Gαi に結合することが知られているため，SLC-1 も同様の情報伝達系を動員すると予測できる．そこで私達は Gαq タンパク質の C 末端 5 残基を Gαi3 にしたキメラを作成し，それを SLC-1 とともに CHO 細胞内へ一過性に共導入し，Gαi を経たシグナルをカルシウム濃度の変動に置き換えて測定する方法を取った．ラット脳抽出物を出発材料とし，6 段階の精製過程を得て，マス解析，アミノ酸シークエンスを行なった結果，内在性リガンドは既知の MCH そのものであった(18)．我々とほぼ同時期に独立した 4 つの研究グループから同じ結論が報告されている(19)．このうち 2 グループはケミカルライ

表1　組織抽出物からのオーファンリガンド同定例

発表年	リガンド	受容体	使用組織・重量	測定した細胞内情報伝達系	使用細胞
1995	OFQ	ORL-1	ブタ視床下部 10 kg	cAMP 阻害	Stable CHO
1995	Nociceptin（= OFQ）	ORL-1	ラット脳 35 g	cAMP 阻害	Stable CHO
1998	Apelin	APJ	ウシ胃　2 kg	サイトセンサー（pH）	Stable CHO
1998	Orexin	HFGAN72	ラット脳　200 g	Ca^{2+}	Stable HEK293
1998	PrRP	GPR10	ウシ視床下部　2 kg	アラキドン酸放出	Stable CHO
1999	MCH	SLC1	ラット脳　400 g	Ca^{2+}, cAMP 阻害	CHO transient, stable
1999	Ghrelin	GHSR	ラット胃　40 g	Ca^{2+}	Stable CHO
1999	UTII	GPR14	ウシ視床下部　1 kg	Ca^{2+}	Stable CHO
2000	NMU	GPR66	ラット小腸　170 g	Ca^{2+}	Stable CHO
2001	KiSS-1/ Metastin	GPR54	ヒト胎盤　740 g	Ca^{2+}	Stable CHO
2002	Adenine	ラット MrgA10	ブタ皮質　10 kg	Ca^{2+}	Stable HEK293
2002	EG-VEGF PK1/PK2	GPR73	ウシミルク　3 liter	Ca^{2+}	Stable CHO
2002	NPB	GPR7/8	ウシ視床下部　2 kg	cAMP 阻害	Stable CHO
2002	NPW	GPR7/8	ブタ視床下部　500 g	GTP γS 結合	Stable CHO
2003	NPB	GPR7/8	ウシ視床下部　600 g	メラノフォア凝集反応	メラノフォア細胞
2003	Relaxin-3/ INSL7	GPR135 GPR142	ブタ脳　20 kg	GTP γS 結合	CHO-K1 transient
2004	Succinate	GPR91	ブタ腎臓　6 kg	Ca^{2+}	Stable CHO
2004	NPS	NPS-R	ラット脳　400 g	cAMP 阻害，アラキドン酸放出，Ca^{2+}	Stable CHO

ブラリーを用いるマッチングにより同定に至った．今後は SLC-1 を MCH1R と呼ぶ．MCH1R mRNA は脳において，嗅球前核，梨状皮質，嗅球扁桃体，海馬，顔面神経核，舌下神経核などの食行動および嗅記憶行動に非常に関連の深い部域で高発現していることが明らかとなった．MCH1R は扁桃体，外側中隔核や側坐核 shell でも高発現しているので(20)，MCH システムは快・不快情動発現や報酬行動においても重要な役割を持つことが予想された．

MCH1R のサブタイプ MCH2R は相次いで 7 つの独立した研究室から報告された(21)．このことは如何に MCH 受容体に多くの関心が寄せられているかを示す．その後，驚いたことに，MCH2R はヒト・イヌ・フェレット・アカゲザルに機能的に発現しているが，ラット・マウス・ウサギ・ハムスター・モルモットには存在しないことが判明する(22)．MCH2R の研究については齧歯類では行えないために，その機能解析にはまだ時間がかかると思われる．

2）MCHアンタゴニストの登場

MCH1R ノックアウトマウスも MCH ノックアウトマウスと同様に「ヤセ」の形質を示す(23, 24)．また，MCH1R 選択性アンタゴニスト T-226296 の経口投与は MCH による反応性摂食を抑制する(25) 等，MCH 系の摂食調節・エネルギー代謝への関与についてより直接的な証拠が続々と提出される．T-226296 に続いて発表されたアンタゴニスト SNAP-7941 は長期連日皮下注射により高カロリー食による肥満を防ぐことができた．その効果以上に注目を浴びたのは SNAP-7941 投与により抗うつ作用・抗不安作用が観察されたことである(26)．この報告では強制水泳ストレス・社会的ストレス（見知らぬオスラットの近くに置く）・早期ストレス（産まれてすぐのモルモットの

子供を母親から分離する）という3種の異なる「うつ・不安状態」動物モデルで評価している．当初は驚きを持って受け止められた結果だが，現在では後述するように数種の異なるMCHアンタゴニストが抗うつ・抗ストレス効果を持つことが示された．更にMCH1Rノックアウトマウスの行動解析によりMCH系とうつ・ストレスの関係が次第に明瞭になりつつある(27,28)．食事と精神状態は様々に関連していることはよく知られている．視床下部外側野から中枢神経系に向かって広く投射し，摂食調節系において重要な位置に存在するMCH系がうつやストレスと深く関係していることはむしろ当然なのかもしれない．

最初に述べたようにストレス刺激とそれに対する反応の様式がうつ病発症に大きく関与している可能性は高い．特にHPA軸の頂点にあるCRFは重要である．CRFはストレス刺激により視床下部室傍核より放出され，下垂体からのACTH放出を促進する．興味深いことにMCHアンタゴニストSB-568849の室傍核への直接投与はMCHにより誘発されるCRFの血中への放出を抑制する(29)．その一方，側坐核から視床下部への入力系がうつと関連する回路であることを示した研究がある．Compound 30はMCHの活性部位である環状部に化学的修飾を加えたペプチド性アンタゴニストである(30)．その側坐核への直接投与により摂食量体重ともに減少するばかりか，強制水泳テスト評価系で抗うつ作用が観察された(31)．即ち，MCHの持つ抗うつ作用・摂食抑制作用ともに側坐核に豊富に発現するMCH1Rを介して視床下部へ伝えられたと考えられる．側坐核は報酬系の中心であり薬物中毒における役割が有名な一方，報酬回路の機能欠損がうつの病理と関連を持つことが言われている(32)．2005年にはアンタゴニストATC0065・ATC0175が6種類の動物モデル系において抗うつ・抗不安作用を持つことが報告された(33)．詳細は茶木氏による次章を参照頂きたい．上述の他に少なくとも製薬企業6社がMCH1Rアンタゴニストを特許として登録し(34)，そのうちのいくつかについては摂食に対する効果が発表されている．しかしうつやストレス動物モデルに対する効果については未発表の段階である．

快・不快情動発現の中心であり，抗不安の作用部位といわれている扁桃体においてもMCH1R mRNAは高い発現を示す(20)．極度の不安感や快・不快刺激に対する異常な反応は多くのうつ病患者によく見られる症状である(32)．従って扁桃体にMCHやアゴニスト・アンタゴニストを直接投与して詳細な行動解析することは興味深い．その結果，MCH系による部位特異的な効果が判明し，うつに関係した視床下部への新規入力系が更に判明することが期待できる．

4. その他のオーファン受容体関連リガンドとうつ・ストレス

MCH系に限らず，オーファンGPCRを基に同定された内在性リガンドがうつと関連する例が知られている．ノシセプチン／オルファニンFQ（NC/OFQ）はオーファンGPCRストラテジーにより世界で最初に同定されたオピオイド様新規ペプチドである(6,7)（表1）．10年前に発見され，オピオイド様ペプチドであるために薬理学ツールが充実している．現在までにアゴニスト・アンタゴニスト・KOマウス解析からNC/OFQは痛覚過敏反応の他に学習障害・摂食亢進・抗不安といった多様な中枢性作用を持つことが知られている．最近では強制水泳テストにより新規NC/OFQアンタゴニストの抗うつ作用が報告されている(35)．

オーファンGPCR，FM3/FM4の内因性リガンドとして同定されたNMUはその摂食抑制作用が知られている(36)．しかし最近ではストレス反応に関与することについても注目が集まっている．NMUのラット脳室内投与により摂食抑制，活動量増加，血圧・心拍数増加，体温上昇そしてストレス反応である血中ACTHとコルチコステロンが増加する．NMUは視床下部弓状核に存在し，視床下部室傍核に局在するCRFニューロンに投射するのでCRF系を介してストレス反応に機能していることが推察できる(37)．実際に，CRFノックアウトマウスではNMU投与による活動量の増加が見られず，NMUノックアウトマウスでは室傍核に存在するCRF遺伝子発現が減少することが示されている(36)．受容体が判明した現在，vivoで効果的なNMUアンタゴニストの開発が望まれる．多彩な生理作用を持つグレリン(10）やオレキシン(8,9）においてもCRF系を介してストレス反応・不安に関与する可能性が示唆されている．特にCRFニューロンの活性化がオレキシン産生ニューロンを活性化する報告は興味深い(38)．

ニューロペプチドS（NPS）はごく最近生理機能が判明した特徴ある生理作用を持つペプチドである(39,40)．その脳室内投与により，マウスでは自発運動が促進され，ラットでは覚醒促進を示した．更に，NPSは抗不安に関連した数種類の行動も促進した．うつ病では過度の不安や睡眠障害が関係する場合がよくある．特徴ある作用を持つこの神経ペプチドは抗うつ薬の格好の標的となるかもしれない．

5. おわりに

ヒトにおけるうつ病の症状は主観的な「気分障害」と客観的に観察できる「行動障害」に分けられよう．動物モデルで観察可能とされるのは後者の物理的ストレスによる「うつ状態」ということになっている．従ってヒトにおけるうつ病の複雑な症状と動物モデルにおける結果を単純に関連付けることには慎重を期す必要がある．今後はうつ病患者の SNP 解析（41）や脳画像解析を動物モデルと併用し，うつを惹起する生物学的要因の検証を積み重ねることが大切であろう．その結果，大脳辺縁系で評価されたストレス情報を視床下部へと伝える役割を果たす新しい神経ペプチド回路が明らかとなり，抗うつ効果に優れ，副作用の少ない抗うつ薬が臨床現場に多数登場することが期待される．その際にオーファン GPCR の生理リガンドの更なる同定は益々重要な創薬ストラテジーとなろう．

謝辞：本総説を執筆するにあたり，貴重な助言を頂きました Dr. Rainer Reinscheid（University of California Irvine）に感謝致します．

文　　献

1）Perez DM. Mol Pharmacol. 2005;67:1383-1384.
2）Vassilatis DK, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:4903-4908.
3）Civelli O, et al. Trends Neurosci. 2001;24:230-237.
4）森正明．化学と生物．2003;41:570-577.
5）Saito Y, et al. Int Rev Neurobiol. 2005;65:179-209.
6）Meunier JC, et al. Nature. 1995;377:532-535.
7）Reinscheid RK, et al. Science. 1995;270:792-794.
8）de Lecea L, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:322-327.
9）Sakurai T, et al. Cell. 1998;92:573-585.
10）Kojima M, et al. Nature. 1999;402:656-660.
11）Hinuma S, et al. Nature. 1998;393:272-276.
12）Kawauchi H, et al. Nature. 1983;305:321-323.
13）Vaughan JM, et al. Endocrinology. 1989;125:1660-1665.
14）Bittencourt JC, et al. J Comp Neurology. 1992;319:218-245.
15）Qu D, et al. Nature. 1996;380:243-247.
16）Shimada M, et al. Nature. 1998;396:670-674.
17）Lakaye B, et al. Biochim Biophys Acta. 1998;1401:216-220.
18）Saito Y, et al. Nature. 1999;400:265-269.
19）Chambers J, et al. Nature. 1999;400:261-265.
20）Saito Y, et al. J Comp Neurology. 2001;435:26-40.
21）Mori M, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2001;283:1013-1018.
22）Tan CP, et al. Genomics. 2000;79:785-792.
23）Marsh DJ, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:3240-3245.
24）Chen Y, et al. Endocrinology. 2002;143:2469-2477.
25）Takekawa S, et al. Eur J Pharmacol. 2002;438:129-135.
26）Borowsky B, et al. Nat Med. 2002;8:825-830.
27）Smith DG, et al. Neuropsychopharmacol. 2005; Epub ahead of print (PMID: 16205780)
28）Roy M, et al. Neuropsychopharmacol. 2005; Epub ahead of print (PMID: 15988472)
29）Kennedy AR, et al. J Neuroendcri. 2003;15:268-272.
30）Bednarek MA, et al. Biochemistry. 2002;41:6383-6390.
31）Georgescu D, et al. J Neurosci. 2005;25:2933-2940.
32）Nestler EJ, et al. Neuron. 2002;34:13-25.
33）Chaki S, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2005;313:831-839.
34）Collins CA, et al. Invest Drugs. 2003;4:386-394.
35）Gavioli EC, et al. Eur J Neurosci. 2003;17:1987-1990.
36）Hanada R, et al. Nat Med. 2004;10:1067-1073.
37）Ozaki Y, et al. Endocrinology. 2002;143:4320-4329.
38）Winsky-Sommerer R, et al. J Neurosci. 2004;24:11439-11448.
39）Sato S, et al. World Patent Application. 2002; WO 02/31145 A1.
40）Xu YL, et al. Neuron. 2004;43:487-497.
41）Thomson PA, et al. Mol Psychiatry. 2005;10:470-478.