

戦略的創造研究推進事業

ERATO

柳沢オーファン受容体プロジェクト
追跡評価用資料

2012年5月

独立行政法人 科学技術振興機構

目次

報告書要旨	1
プロジェクトの展開状況	3
第1章 プロジェクトの概要	4
1.1 プロジェクト開始時から現在に至る科学技術や社会の背景	4
1.1.1 科学技術の背景	4
1.1.2 社会の背景	9
1.2 プロジェクトの狙い	11
1.3 プロジェクト終了時点における主な研究成果	12
1.3.1 オレキシンの機能・生理作用	12
1.3.2 オーフアン GPCR のリガンド探索	14
1.3.3 代謝調節	16
第2章 プロジェクト終了から現在に至る状況	19
2.1 各研究テーマの現在の状況	19
2.1.1 オレキシンの機能・生理作用	19
2.1.2 オーフアン GPCR の機能・生理作用	22
2.1.3 代謝調節	25
2.2 プロジェクトメンバーの活動状況	26
第3章 プロジェクト成果の波及と展望	27
3.1 科学技術への波及と展望	27
3.1.1 オレキシン系の機能・生理作用	27
3.1.2 GPCR に関する研究	30
3.1.3 プロジェクト関連の主要論文の被引用件数の推移	31
3.2 社会経済への波及と展望	33
3.2.1 創薬への応用	33
3.2.2 診断への応用	34
参考表	36
参考文献	40

報告書要旨

7回膜貫通受容体のGPCR(Gタンパク質共役受容体)は、タンパク質をコードするヒトゲノムの中で大きなファミリーの一つであり、細胞間のシグナル伝達に重要な役割を果たすとともに病気の大きな要因とも関連している膜タンパク質である。

本プロジェクトは、それらのオーファン受容体について、その内因性リガンドを同定すると共に、オレキシンも含めてGPCR/リガンドを介する細胞間シグナル伝達ネットワークの機能解明を行い、生体内の高度な制御機構を解明することを目的として、2001年10月から2007年3月まで3つの研究テーマで実施された。

第1の研究テーマ「オレキシンの機能・生理作用」では、オレキシンニューロンによる睡眠/覚醒のメカニズムやエネルギーバランス/摂食行動/肥満の制御について明らかにした。オレキシンによる体重制御作用がオレキシンタイプ2受容体(OX2R)を介しての作用であることを解明し、ナルコレプシー患者の肥満との関連を明らかにした。第2の研究テーマ「オーファンGPCRのリガンド探索」では、GPR7/8、GPR41、GPR103、GPR109Bのリガンドを同定することができたが、論文発表は残念ながら他の研究グループに先を越された。しかし、これらのGPCR/リガンドの機能・生理作用の解明を進めて、脳内のGPR7がストレスに伴う恐怖や不安等の情動記憶に関係していること、ヒトでGPR7遺伝子に非保存性のSNP¹が存在すること、腸管表皮細胞に発現しているGPR41が腸内微生物叢の生成する短鎖脂肪酸を介して肥満症等の宿主のエネルギー代謝に関係していること、GPR103の内因性ニューロペプチドが摂食、行動覚醒および血圧の制御に関与していること、さらに、GPR109Bがヒト好中球に多く発現して、そのリガンドのD-アミノ酸が好中球の走化性を誘導する作用を有することを明らかにした。

第3の研究テーマ「代謝調節」では、核内受容体の研究からPPAR δ ²がメタボリックシンドローム改善のための治療薬として創薬のよいターゲットになること、また、転写因子SOX6³がインスリン合成に重要な転写因子PDX1⁴のリプレッサーであり、膵 β 細胞でのWnt/ β -カテナインシグナルを抑制すること、さらに、LPR5⁵がWntシグナルの受容体であり、この受容体の欠損が骨密度の低下、軽度の高脂血症、インスリン分泌の低下をともなうことを明らかにし、Wntシグナルが骨形成に関与する新規なメカニズムを明らかにした。

本プロジェクト終了後、「オーファン受容体のリガンド探索」の研究テーマは終息したが、「オレキシンの機能・生理作用」及び「同定されたオーファンGPCRの生理作用」の研究は、テキサス大学の柳沢研究室と金沢大学の桜井研究室において継続され、また、「代謝調節」の研

¹ Single Nucleotide Polymorphism : 一塩基多型

² Peroxisome proliferator-activated receptor-delta : ペルオキシソーム増殖活性化受容体 δ

³ HMG(high mobility group) box を有する転写因子ファミリーの一員 (ヒトでは20個存在)

⁴ PDX1 : pancreatic-duodenal homeobox factor-1

⁵ LPR5 :low-density lipoprotein receptor-related protein 5

究テーマは、東京大学先端科学技術センター・代謝医学分野の酒井研究室に引き継がれている。

また、本プロジェクトの直接の成果ではないが、2005年に米国睡眠医学会による「睡眠障害国際分類第2版」に髄液中のオレキシン値低下がナルコレプシーの補助診断基準として採用されたのは、柳沢等によるオレキシン発見以降の柳沢グループも含めた多数の研究者の研究成果である。また、オレキシン系の脳内における機能解明を通して、脳生理学の分子レベルでの研究の発展に大きく貢献している。

また、オーファン GPCR 研究の創薬への応用に関しては、本プロジェクトの直接の成果ではないが、いくつかの化合物が臨床試験段階にある。

オレキシン系研究の治療薬への応用では、現在、3種類のアンタゴニスト、Almorexant (Acterion Pharmaceuticals 社/GlaxoSmithKline 社)がフェーズⅢ(米国 & EU)、MK-4305/Suvorexant(Merck 社)がフェーズⅢ(米国 & EU)、さらに、GSK649868 (GlaxoSmithKline 社)がフェーズⅡ(ドイツ)の臨床段階にある。

その他のオーファン GPCR では、例えば、武田薬品工業の GPR40 のアゴニスト (TAK-875)が2型糖尿病治療薬として日本でフェーズⅢ、米・欧・中南米でフェーズⅢ、OT7T175(GPR54)のアゴニスト(メタスチン誘導体)がフェーズⅠの臨床段階にある。また、京都大学/アスピオファーマ社のヒトグレリンが、日本で神経性食欲不振症の治療薬でフェーズⅢの臨床段階にある。

プロジェクトの展開状況

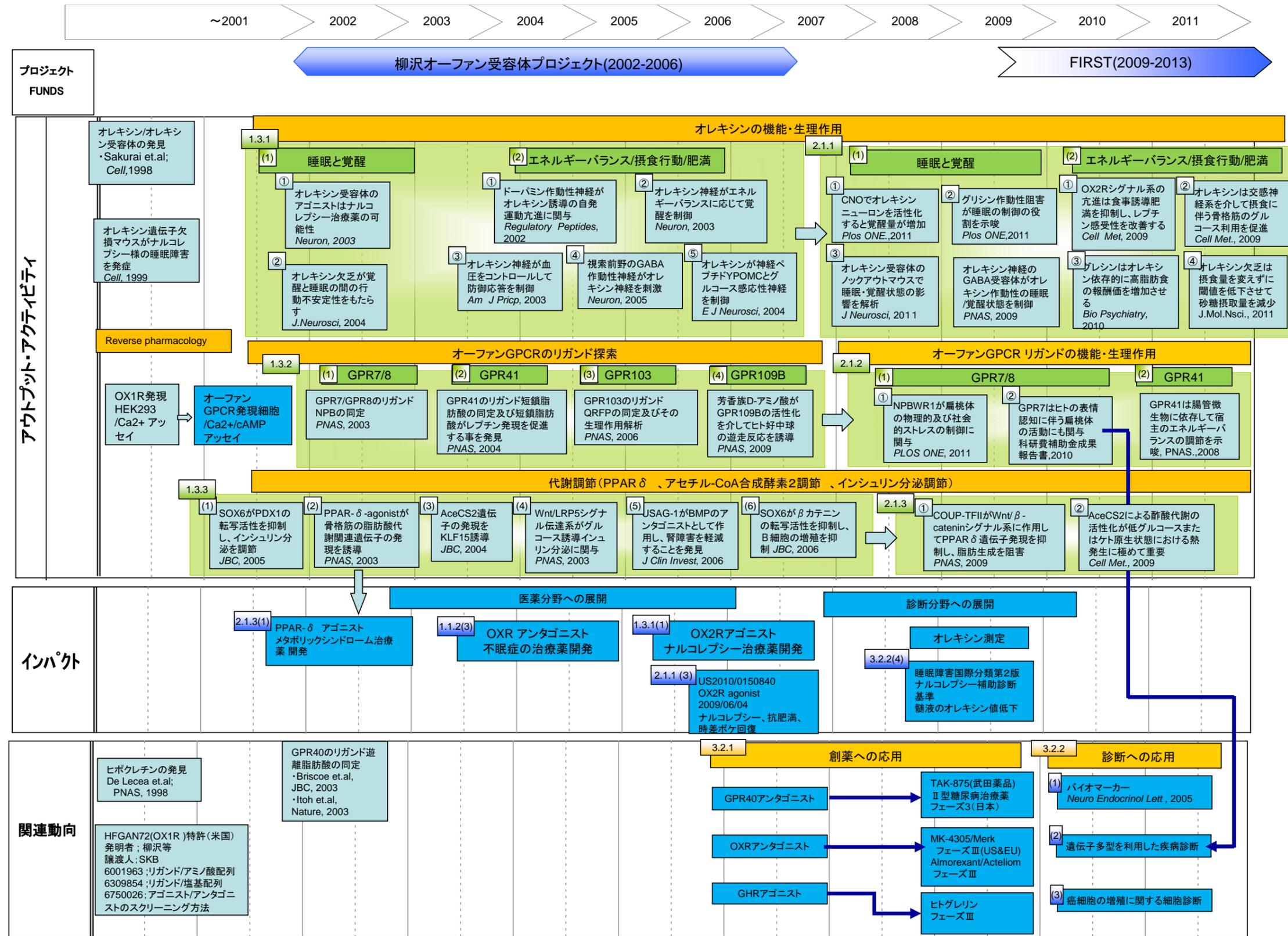


図 プロジェクトの展開状況 (まとめ図)

第1章 プロジェクトの概要

1.1 プロジェクト開始時から現在に至る科学技術や社会の背景

1.1.1 科学技術の背景

既存の医薬品の多くは、GPCR をターゲットにしたものであり、全世界の医薬品売上の上位を占める医薬品の半数以上は GPCR のアゴニスト(作動薬)またはアンタゴニスト(拮抗薬)である。ここ二十数年の遺伝子情報の蓄積からヒトゲノムには内因性リガンドが不明な GPCR いわゆるオーファン GPCR が数多く存在することが分かり、当時、オーファン GPCR 及びそのリガンドが創薬のターゲットとして期待されていた。

GPCR 遺伝子クローニング及びそのリガンド探索は、1970 年代以降の遺伝子工学の発展とともに進歩してきたといえる。以下に、その動向を説明する。

(1) GPCR 遺伝子クローニングの動向

① 遺伝子工学の発展

1973 年、Cohen & Boyer は、制限酵素で切断したプラスミド断片から生物学的に機能を有する新しいプラスミドを *in vitro* で構築して大腸菌に導入して遺伝子組換え体が得られることを発表した⁶。1974 年、Stanford 大学がこの遺伝子組換え技術の特許を米国に出願し、1980 年に特許が成立した⁷。その後の遺伝子組換え技術の急速な進歩が、生命現象の仕組みの解明等の基礎研究や遺伝子組換えタンパク質医薬品や遺伝子組換え作物等の産業的応用に貢献した。

Cetus 社の Mullis が考案した PCR (polymerase chain reaction) の原理「オリゴヌクレオチドプライマーと DNA ポリメラーゼを用いて DNA 合成反応を繰り返すことにより核酸の一定領域を増幅する技術」を応用して、1985 年、Saiki 等は PCR 法による鎌状赤血球症の迅速遺伝子診断法を発表した⁸。1988 年、Cetus 社の研究グループは耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いた PCR 法を開発し発表した⁹。これ以降、PCR 法の簡便化、自動化が進められ、幅広い応用可能な DNA 増幅法として普及することになった。

1990 年からヒトゲノムの全塩基配列を解析するヒトゲノム計画が開始され、2000 年 6 月 26

⁶ Cohen SN *et.al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 70, 3240-3244, 1973 (参考文献 1)

⁷ US 4,237,224 (参考文献 2)

⁸ Saiki RK *et.al*, *Science*, 230, 1350-1354, 1985 (参考文献 3)

⁹ Saiki RK *et.al*, *Science*, 239, 487-491, 1988 (参考文献 4)

日に全ゲノムのドラフトが完成した。2001年2月にそのドラフトの詳細な情報が *Nature* に公開され、一方、独自にヒトゲノム解析を進めていた *Celera Genomics* 社もヒトゲノムの全塩基配列を *Science* に公開した。現在、ヒトゲノムの DNA 塩基配列のデータベースはインターネットを介して誰でも利用でき、これらのデータを解析する多くのプログラムが開発されている。

② GPCR 遺伝子クローニング技術の発展

従来、GPCR遺伝子の取得は、生物活性を指標にしたGPCRタンパク質の単離およびそのアミノ酸配列に基づいて遺伝子配列を決定する方法で行われていたが、1986年、Dixon等は遺伝子工学の技術を応用して、哺乳動物のGPCRとして初めてハムスター $\beta 2$ アドレナリン受容体遺伝子を、精製タンパク質のペプチドフラグメントに相補的なオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーションのプロープに用いハムスターのゲノムライブラリーからクローニングした¹⁰。

1989年、Libert等はPCR法を利用してGPCRの膜貫通ドメインに保存された共通のアミノ酸配列に対する縮重プライマー(degenerate primer)を用いて4つの新規GPCRをクローニングすることに成功した¹¹。

その後、GenBank等のESTデータベース¹²やGPCRDB¹³等のバイオインフォマティクス関連のデータベースが充実して、大学、製薬企業、ベンチャー企業などにより数多くの新規GPCR遺伝子がクローニングされるようになった。

(2) オーフアン GPCR のリガンド探索の動向

ヒトゲノム計画で得られたゲノム配列の解析から、ヒトにはGPCRファミリーに属する約720の遺伝子が存在し、嗅覚受容体遺伝子を除く約360の受容体のうち、内因性リガンド既知の約210の受容体を除いた約150が内因性リガンド又は機能が不明なオーファンGPCRであることが判明した¹⁴。その内訳は、クラスAのロドプシン様受容体が約110と最も多く、次いでクラスBのセクレチン受容体ファミリーが約40、クラスCの代謝型グルタミン酸受容体が約5であった。

① リガンド探索技術の発展

1990年代に入り、オーファン GPCR を動物細胞の膜表面に発現させて、その受容体の機

¹⁰ Dixon RA *et.al*, *Nature*, 321, 75-79, 1986 (参考文献 5)

¹¹ Libert F *et.al*, *Science*, 244, 569-572, 1989 (参考文献 6)

¹² Expressed sequence tag(EST) database。転写産物の目印として使われる。

¹³ <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ReceptorFamiliesForward?type=GPCR> (参考文献 7)

¹⁴ Wise A *et.al*, *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 43-66, 2004 (参考文献 8)

能を解析する逆転薬理学 (reverse pharmacology)の研究手法が導入され、また、それまでのリガンドの受容体結合により放出されるファーストメッセンジャーの低分子伝達物質等を測定する方法に代わり、リガンドにより活性化された GPCR によって誘導されるセカンドメッセンジャーとして細胞内の cAMP やカルシウムの濃度変化を測定する高感度なアッセイ方法が開発され、オーファン GPCR リガンドのハイスループットな探索が可能になった。その他に、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) のメラニン保有細胞を用いる比較的簡便な高感度なメラノソーム凝集アッセイ法も開発された。

また、バイオインフォマティクスの急速な発展によりオーファン GPCR およびその潜在的なリガンドに関する遺伝情報が豊富になり、これらの相同性配列情報がデータベース化されてオーファン GPCR のリガンド探索に応用されるようになった。例えば、これまで、多くの場合、オーファン GPCR リガンド探索には、ラット、ウシ、ブタ等の脳の抽出液をリガンドの分離精製のための出発材料として用いて精製に相当の労力と時間を要してきたが、ひとつのリガンドが同定されるとその遺伝子情報を使って、その受容体と系統発生的分類 (phylogenetic classification) で相同性のあるオーファン受容体を探して評価することにより、出発材料からリガンドを精製することなくリガンド探索が可能になった。

② オーファン GPCR のリガンド探索

前項で述べてきたように、1970 年代以降の遺伝子工学の発展に伴って、オーファン GPCR 遺伝子のクローニング及びそのリガンド探索は急速に進歩してスピードアップされ、オーファン GPCR リガンドの同定に関する論文発表が増加してきた。

表1は、Wise等の論文¹⁵に記載されている表「逆転薬理学の手法で同定されたオーファン GPCR リガンド」を基に、さらにその他のリガンドを補充したものであり、図1は表1に記載されたリガンド同定の原著論文数の推移を示したものである。図1から分かるように、1998 年頃から急激に増加してきた論文数が、1999 年～2001 年をピークに次第に減少するようになり、2007 年以降は新規リガンドの同定に関する報告が著しく少なくなってきた。

その理由としては、逆転薬理学の手法でリガンド探索に利用されていたターゲット受容体発現細胞の GPCR はモノマーであり、これらの GPCR モノマーを活性化できる内因性リガンドがほとんど出尽くしたことが原因と考えられている。

¹⁵ Wise A *et al.*, *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 43-66, 2004 (参考文献 8)

表 1 同定されたオーファン GPCR/リガンド

No	オーファン GPCR	リガンド	発表年	No	オーファン GPCR	リガンド	発表年
1	BRS-3	Bombesin	1993	43	TG1019/R527	Eicosanoids	2002
2	ORL-1	Nociceptin/OrphaninFQ	1995	44	LGR7 /LGR 8	Relaxin	
3	AZ3B	C3a	1996	45	GPR77	C3a	
4	EDG3/SIPR3		1997	46	ZAQ/15E	Prokineticins	
5	Orexin-1 and -2	Orexin-A/B	1998	47	GPR7	NPB/NPW	
6	GRP10/hGR3	PRP		48	GPR8	NPB/NPW	
7	APJ	Apelin		49	TGR5	Bile acid	
8	CRLR	CGRP		50	GPR41	FFA	
9	EDG1/S1PR1	S1P		51	GPR42	FFA	
10	EDG2/LPA1	LPA		52	SNSR3	BAM22	
11	EDG-4/LPA2	LPA		53	GPR43	FFA	
12	EDG5/S1PR2	S1P	1999	54	HM74A/GPR109A	Nicotinic acid	
13	KIAA0001	UDP-glucose		55	GPR40	FFA	
14	GHS-R	Ghrelin		56	MAS	Angiotensin1-7	
15	GRP14	UrotensinII		57	OGR1/ GPR4	Proton-sensing	
16	HG57(Cys-LTIR)	LTD4		58	GPR103/AQ27	QRFP	
17	GPR38	Motilin		59	TGR7	β-alanine	2004
18	GPR24/SLC-1	MCH		60	FM-4/TGR-1	Neuroedin 8	2005
19	HMTMF81	Cys-LTs		61	GPR119	LPC	
20	RUP7	Histamine		62	RDC1/CXCR7	CXCL-12	
21	GALR2	GALP		63	GPR120	FFA	
22	BG3	Histamine	2000	64	GPRC6A	L-α-amino acids (L-Arg, L-Lys,L-ornithine)	
23	EDG7/LPA3	LPA		65	GPR17	Uracil nucleotides	2006
24	OGR-1	SPC		66	GPR18	N-arachidonylglycine	
25	EDG6/S1PR4	S1P		67	GPR34	lysoPS	
26	EDG8/S1PR5	S1P		68	GPR35	Kynurenic acid	
27	PSECO146	LTB4		69	GPR75	RANTES	
28	FM-3(TGR-1)	Neuroedin U		70	GPR84	Medium-chain FFA	
29	SNORF33	Tryptamine		71	GPR92	LPA	
30	HH4R/GGPRv53/AXOR35/GPR105	Histamine		72	GPR55	Cannabinoid	
31	HLWAR77	Neuropeptides		73	GPR87	LPA	2007
32	OT7T022	RFRP		74	GPR1	Chemerin	2008
33	CRTH2	PG-D2	2001	75	P2Y10	S1P	
34	OT7T175(GPR54)	Metastin/Kiss-1		76	P2Y5	LPA	
35	G2A	LPC		77	GPR109B	Aromatic D-AA	2009
36	P2Y12	ADP					
37	MCH2	MCH					
38	TDAG-8	Psychosine					
39	GPR4	SPC					
40	GPR44	PGD2					
41	GRP86	ADP					
42	SP1999	ADP					

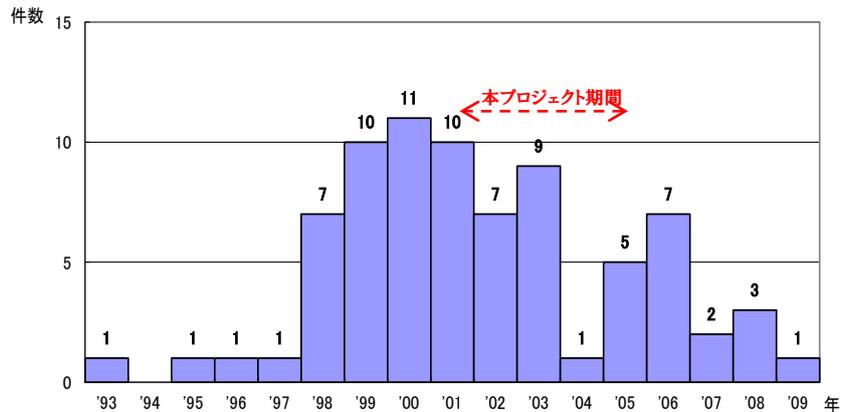


図 1 同定されたオーファン GPCR/リガンドの推移 (表 1 に基づく)

従来、GPCR は細胞表面でモノマーとして存在してリガンドにより活性化されるもの

と考えられていたが、GPCRの中には細胞表面でオリゴマーを形成した状態で存在してリガンドにより活性化されるものがあることが知られるようになった¹⁶。

下図はGPCRのオリゴマー形成によるシグナル伝達を示した模式図である¹⁷。

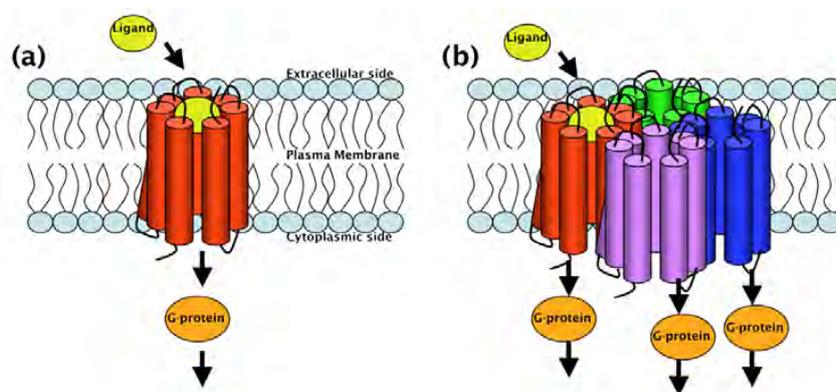


図 2 GPCR のオリゴマー形成によるシグナル伝達を示した模式図

(a) モノマーGPCRのシグナル伝達

(b) オリゴマーGPCR(ホモ/ヘテロ)のシグナル伝達: 単一又は複数のリガンドが一つ或いはいくつかの受容体に結合すると、オリゴマー複合体中の隣接する受容体を活性化すると考えられる。

図 3 には、GPCR オリゴマーに関する原著論文の推移を示したが、2001 年以降に急激に論文が増加して行く傾向にあることが分かる。また、この GPCR オリゴマーに関する論文が急激に増加した時期と GPCR モノマーを用いたリガンド探索による新規リガンドの発見が減少して行く時期（実際の新規リガンド発見は、論文発表の 1～2 年前と推定される）が一致している。

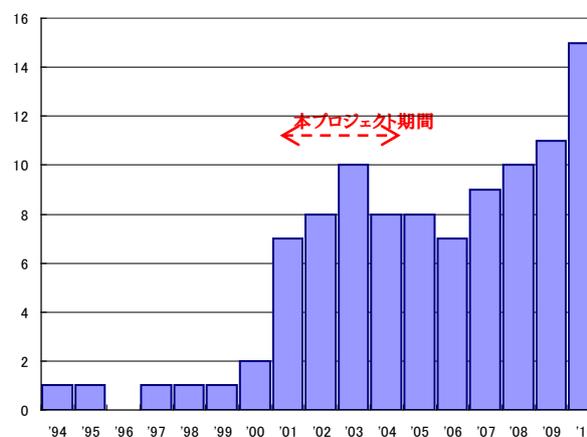


図 3 GPCR オリゴマー に関する論文数の推移

※トムソン・ロイター社の Web of Science (WOS)を用いて、「GPCR oligomerization」で検索した原著論文の推移を示した (2011/12/12 現在)。

(3) オレキシン研究の動向

¹⁶ Vilardaga JP *et.al*, *J. Cell Sci*, 123, 4215-4220, 2010 (参考文献 9)

¹⁷ Skrabanek L *et.al*, *BMC Bioinformatics*, 8:177, 2007 (参考文献 10)

・1998年、柳沢&桜井等はオーファンGPCR/HFGAN72を発現させたHEK293細胞を用いたアッセイ系により、摂食行動を制御する2つの新規ニューロペプチド(オレキシンA及びオレキシンB)を発見した¹⁸。WOSによる「orexin」の検索の結果では、1998年～2011年の原著論文と総説の数は2138報に達し、その中で上記論文は被引用件数トップの1980件となっている(2012/1/30現在)。

・1999年、de Lecea等はオレキシンが睡眠/覚醒を制御して、オレキシン遺伝子欠損マウスがヒトのナルコレプシー様の睡眠障害を示すことを報告した¹⁹。

1.1.2 社会の背景

(1) プロジェクト開始時の状況

既存の医薬品の多くが受容体、その中でも特にGPCRをその標的としており、世界的にも売上が上位にある医薬品にはGPCRのアゴニストやアンタゴニストが多い。そのため、1990年代半ば以降、製薬企業、大学、バイオベンチャー企業が中心となって、前項で述べたような科学技術を背景に創薬ターゲットとしての新規オーファンGPCRのクローニングおよびそのリガンド探索を積極的に進めていた。

国内の製薬企業でも、武田薬品工業は既に1995年頃から新たな創薬ターゲットとしてオーファンGPCRに注目して、オーファンGPCRクローニング及び内因性リガンド探索を開始していた²⁰。その成果として、1998年以降、GPR10のリガンドとしてPrRP(プロラクチン放出ペプチド)、APJのリガンドとしてApelin、SLC-1のリガンドとしてMCH(メラニン凝集ホルモン)、GPR14のリガンドとしてUrotensin II、FM-3/TGR-1のリガンドとしてNeuromedin U、OT7T022のリガンドとしてRFamide-related peptides、OT7T175のリガンドとしてMetastin、ZAQ/15EのリガンドとしてProkineticin、GPCR7/8のリガンドとしてNPW/NPB、GPR40のリガンドとしてfree fatty acid、AQ27/GPR103のリガンドとしてQRFP(Pyroglutamylated RFamide peptide)、TGR7のリガンドとしてβ-alanine、GPR34のリガンドとしてLysophosphatidylserine等の多数のオーファンGPCRの内因性リガンドの発見につながった。現在、その中で、OT7T175アゴニスト(フェーズI: Metastin誘導体)とGPR40アゴニスト(フェーズIII: 2型糖尿病治療薬)の2つが臨床試験に入っている²¹。

¹⁸ Sakurai T *et.al*, *Cell*, 92, 573-585, 1998 (参考文献 11)

¹⁹ Chemelli RM *et.al*, *Cell*, 98, 437-451, 1999 (参考文献 12)

²⁰ http://www.jpma.or.jp/medicine/genome/specialist/int/int002_2.html (参考文献 13)

²¹ http://www.takeda.co.jp/pdf/usr/default/12_2_47242_2.pdf (参考文献 14)

その当時の海外におけるオーファンGPCR研究に対する期待の大きさを知る参考資料として、2002年3月、英国Horshamで開催されたThe Society for Medicines Research(英国)主催のシンポジウム「Research Strategies for Orphan G-Protein-Coupled Receptors」²²について紹介する。本シンポジウムでは、GlaxoSmithKline社、Merck社、Pfizer社、AstraZeneca社等の大手製薬企業、大学、バイオベンチャーの研究者等による講演が行われた。以下に、いくつかの講演を紹介する。

Pfizer社のFidockは1999年～2001年までのオーファンGPCRのリガンド同定に関する論文数を示し、同定件数は急激に増加しているが、まだ175個のオーファンGPCRがリガンド不明であると述べている。Pharmagene社のColeman(旧Glaxo社で35年間、GPCR分野での創薬に関与)は、Glaxo社のGPCRをターゲットにした分子標的医薬品(salbutamol, ranitidine, labetalol, sumatriptan, ondansetron, salmeterol)の成功例を紹介するとともに、2000年の世界トップ100の医薬品の中で26個がGPCRをターゲットにした医薬品であり、年間売上が200億ドルを超えていると述べている。Manchester大学のAttwood教授は、バイオインフォマティクスの塩基モチーフデータベース等を使用する場合のエラー(false negatives, false positives, annotation errors等)に注意が必要なこと、また、上記のデータベースに過度に依存したエキスパートシステムを使用する場合の注意を喚起している。

GlaxoSmithKline社のWiseは、同社のオーファンGPCRリガンド探索が6つのGPCRファミリーの中でクラスA(ロドプシン様受容体)にフォーカスしていること、GPCR発現細胞として哺乳動物細胞(CHO, HEK293)、酵母、アフリカツメガエルを使用していることを述べている。

(2) 現在の製薬企業の動向

2007年以降、1.1.1で述べたようにオーファンGPCRの新規リガンド同定が急激に減少し、探索研究の投資効率が低下しているため、製薬企業の中には自社内でのオーファンGPCRのリガンド探索部門を縮小して、新規のハイスループットなスクリーニング技術を開発したベンチャー企業と提携してオーファンGPCRのリガンド探索を行う傾向にある。以下に、その具体例を挙げる。

- ・例1：GlaxoSmithKlein社が、PathHunter™ β -arrestin assayの基盤技術をもつDiscoverRx社およびMedical Research社と提携²³。
- ・例2：武田薬品工業の英国子会社が、GPCR-HIT(G-Protein-Coupled Receptor Heteromer Identification Technology)の基盤技術をもつDimerix Bioscience社

²² <http://www.smr.org.uk/smr/Archive/PastMeetings/Downloads/20020307.pdf> (参考文献 15)

²³ <http://www.discoverx.com/about/about-press.php> (参考文献 16)

と提携²⁴。

(3) オレキシン研究の医薬品開発への応用

これまでの研究成果からオレキシンが脳内で覚醒状態の維持に働いていることが明らかになっているため、現在、3つのオレキシン受容体のアンタゴニストが原発性不眠症(primary insomnia)の治療薬として臨床試験段階にある。

- Almorexant(Acterion 社/GlaxoSmithKlein 社の共同開発)

2011年2月16日に米国でのフェーズⅢ終了後にGSK社は開発を断念した。薬効や副作用が原因でなく、不眠症の患者に常用される睡眠薬等の他の薬の肝臓における代謝に影響することが中止の理由のようである。

Acterion社は別の薬剤で開発を継続する意向。

- MK4305(Merck 社)

米国でフェーズⅢの臨床試験中。

- GSK649868(GSK 社)

ドイツでフェーズⅡの臨床試験中。Almorexantのバックアップ化合物。

(4) オーフアンGPCRの医薬品開発への応用

現在、臨床試験段階にあるオーファンGPCRをターゲットにする治療薬でフェーズⅢにあるのは、糖尿病治療薬として武田薬品工業のGPR40のアゴニスト(TAK-875)、神経性食欲不振症治療薬として京都大学/アスビオファーマ社のGHRのアゴニスト(ヒトグレリン)がある²⁵。なお、その他の臨床試験段階にある治療薬については、3.2.2の表3に挙げた。

1.2 プロジェクトの狙い

2000年初頭、ヒトや他の動物種のゲノム・シーケンスが解読され、ヒトゲノム中にはGPCRをコードする遺伝子が約800存在し、これらの多くが内因性のリガンドが不明なオーファン受容体となっていることが明らかになった。しかし、このオーファンGPCRとそのリガンドについての研究は、基礎研究のターゲットとしてだけでなく、創薬のターゲットとしても非常に注目を集めていて、当時、国内外の多くの製薬企業も参入して非常に競争が激しい分野であった。

²⁴ <http://www.businesswire.com/news/home/20110414007137/ja/> (参考文献 17)

²⁵ <http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ghrelin/html/rinsho.html> (参考文献 18)

これらのオーファン受容体は、その存在が分かっただけではその生理作用の解明には至らず、その内因性リガンドが同定され、受容体とリガンドの組み合わせが明らかになって初めて生理作用の解明につながることを期待されるものである。

本プロジェクトは、その当時、まだ数多く存在すると考えられていた内因性リガンド不明のオーファン受容体のリガンドを探索し、発見されたリガンドとGPCRを利用して新規な細胞間情報伝達ネットワークの機能解明を行い、生体内の高度な制御機構を解明することを目的として企画された。新規なリガンド発見が契機となり、予期しない生理機能が解明され、これまでにないような大きな研究分野に発展してゆくことが期待された。

1.3 プロジェクト終了時点における主な研究成果

「オレキシンの機能・生理作用」の研究テーマについては、柳沢グループと桜井グループが担当し、オレキシニューロンによる睡眠/覚醒のメカニズムやエネルギーバランス/摂食行動/肥満の制御について解明するとともに、オレキシニンによる体重制御作用がオレキシントイプ2受容体(OX2R)を介しての作用であることを明らかにした。

「オーファンGPCRのリガンド探索」の研究テーマは、柳沢グループ、桜井グループ、酒井グループの3つの研究グループで実施され、GPR7/8、GPR41、GPR103、GPR109Bのリガンドを同定することに成功したが、論文発表では他の研究グループに先を越された。しかし、同定した各GPCRの機能について解明し、いくつか評価できる成果が得られた。

「代謝調節」の研究テーマは、酒井グループが担当し、核内受容体の研究からPPAR δ がメタボリックシンドローム改善のための治療薬として創薬のよいターゲットになること、また、転写因子SOX6がインスリン合成に重要な転写因子PDX1のリプレッサーであり、膵 β 細胞でのWnt/ β -カテニンシグナルを抑制すること、さらに、LPR5がWntシグナルの受容体であり、この受容体の欠損が骨密度の低下、軽度の高脂血症、インスリン分泌の低下をともなうことを明らかにし、Wntシグナルが骨形成に関与する新規なメカニズムを明らかにした。

以下、プロジェクト終了時点における主な研究成果について紹介する。

1.3.1 オレキシンの機能・生理作用

(1) 睡眠と覚醒

① ナルコレプシー/情動脱力発作(cataplexy)は、視床下部のオレキシニン欠乏に伴う神経疾患であり、覚醒の維持ができないこととレム睡眠から覚醒の出現という2つの特徴的な症状を示す。イヌでは、OX2Rの変異がヒトのナルコレプシーと同じ症状を示すことが分かっているが、生化学的にはヒトのナルコレプシーと非常に異なる点が多く、オレキシニンシグナル伝達系にお

ける2つの受容体(OX1R、OX2R)の役割は不明である。

OX2Rノックアウトマウスとオレキシン欠損マウスのナルコレプシー症状を詳細に比較する実験を行い、オレキシンによる覚醒の維持と正常なノンレム睡眠の出現にはOX2Rシグナル伝達系が必要なこと、さらに、レム睡眠の正常な制御にはOX2Rの活性化だけでなく、青斑核のOX1Rを介するような他のシグナル伝達系やレム睡眠関連現象のゲート開閉および新生に関係するメソ細孔構造が必要であることを明らかにした。また、これらの実験結果から、オレキシン受容体のアゴニストがナルコレプシーの治療薬となる可能性を示唆した²⁶。

② ナルコレプシーはオレキシン欠乏で起こるが、ナルコレプシーの眠気の基礎となる生理的なプロセスは不明である。ナルコレプシーのモデルとしてオレキシンノックアウトマウスを用いて、3つの仮説、i)睡眠/覚醒の概日制御の不良、ii)覚醒領域の不適切な活性化、iii)睡眠恒常性の異常、これらを検証するために詳細に実験を行った。その結果、オレキシン欠乏による断片的な眠気は、睡眠恒常性の異常、概日制御の不良、または、覚醒システムの根本的な欠損ではなく、睡眠と覚醒の間の遷移に対する閾値が顕著に低いことによる行動状態の不安定に起因することを明らかにした²⁷。

(2) エネルギーバランス/摂食行動/肥満

① オレキシンにより誘導される自発運動亢進へのセロトニン作動性系の関与を証明するために、マウスに抗精神薬(ハロペリドール)や種々のセロトニン拮抗薬を投与し、その行動解析を行い、ドーパミン作動性神経がオレキシン誘導の自発運動亢進に関与していることを明らかにした²⁸。

② オレキシン遺伝子のプロモーターを利用して、オレキシン産生神経でGFPが特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、オレキシン産生がグルコースや摂食抑制性のレプチンによって抑制され、摂食亢進性のグレリンによって刺激されることが分かり、オレキシンニューロンがエネルギーバランスに応じて覚醒を制御していることを明らかにした²⁹。

③ オレキシンの防御応答及び心血管調節への影響を調べるために、オレキシンノックアウトマウスを作成して、GABA-A受容体拮抗薬の投与や覚醒状態における心血管パラメーターや行動解析を調べた。その結果、オレキシンニューロンが血圧をコントロールして、防御応答を制

²⁶ Willie JT *et.al*, *Neuron*, 38, 715-730, 2003 (参考文献 19)

²⁷ Mochizuki T *et.al*, *J Neurosci*, 24, 6291-6300, 2004 (参考文献 20)

²⁸ Matsuzaki I *et.al*, *Regulatory Peptides*, 104, 119-123, 2002 (参考文献 21)

²⁹ Yamanaka A *et.al*, *Neuron*, 38, 701-713, 2003 (参考文献 22)

御していることが分かった³⁰。

④ 破傷風毒素とGFPの融合タンパク質がオレキシン産生神経で特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、視床下部外側野のオレキシン産生神経から発する神経ネットワークを明らかにした。視索前野(preoptic area)のGABA作動性神経がオレキシン神経を刺激することが分かった³¹。

⑤ 視床下部のオレキシン神経、NPY (neuropeptideY)神経、メラニン凝集ホルモン(MCH)神経、POMC (proopimelanocortin)神経をGFPで標識したトランスジェニックマウスを作成し、個々の神経細胞について摂食抑制ホルモンのレプチンの作用を調べた。その結果、オレキシンが直接、弓状核及び視床下部腹内側核にあるNPY、POMC及びグルコース作動性神経をレプチンとの相互作用で制御することを明らかにした³²。

1.3.2 オーフアン GPCR のリガンド探索

(1) オーフアン受容体 GPR7/8 の内因性リガンド NPW/NPB の発見と NPW の生理機能の解明

① GPR7/8 の内因性リガンドの同定³³

ウシ脳視床下部抽出液から GPR7 の内因性リガンドを単離し、構造決定ならびに特性評価を行った。このペプチドは、既に 2002 年に武田薬品工業の Fujii 等によって発表されていた N 末端トリプトファンがブロム化されている NPB と命名された 29 アミノ酸残基のペプチドと同一であった。また、GPR7 と相同性の高い GPR8 のリガンドを EST データベースで検索して推定相同ペプチドを同定した所、Shimomura 等³⁴が発見していた NPW と命名された 30 アミノ酸残基のペプチドと同一であった。GPR7 は NPB と NPW の両方のリガンドに対してナノモル濃度で高い感受性を示すが、一方、GPR8 は NPW にのみ選択性が認められた。

② NPW の局在および NPW ニューロンの投射³⁴

³⁰ Kayaba Y *et.al*, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285,R581-R593, 2003 (参考文献 23)

³¹ Sakurai T *et.al*, *Neuron*, 46, 297-308, 2005 (参考文献 24)

³² Muroya S *et.al*, *European J. Neuroscience*, 19, 1524-1534, 2003 (参考文献 25)

³³ Tanaka H *et.al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 6251-6256, 2003 (参考文献 26)

³⁴ Shimomura Y *et.al*, *J Biol Chem*, 277, 35826-35832, 2002 (参考文献 27)

³⁴ Kitamura Y *et.al*, *Brain Res.* 1093, 123-134, 2006 (参考文献 28)

マウス脳での *in situ* hybridization の結果から NPW を発現しているニューロンは、中脳部位に局在していること、NPW の特異抗体を用いた免疫組織染色から、NPW ニューロンが扁桃体中心部および分界状床核にのみ投射していることが分かった。

また、NPW がストレスや情動の制御、特に恐怖や不安に関連した生理的及び行動機能の制御に関与していることが示唆された。

③ 痛覚刺激に関する解析³⁵

NPB 遺伝子ノックアウトマウスを用いた実験から、NPB が炎症性疼痛および体重の恒常性に対する応答の調節に関与する因子であることを明らかにした。

また、ノックアウトマウスではストレス負荷時における疼痛刺激に対する異常が認められたことから、ストレス反応時における NPW の関与が示唆された。

(2) オーフアン受容体GPR41 のリガンド短鎖脂肪酸の発見³⁶

オーファン GPR41 を活性化する合成ペプチドを探索する過程で、ペプチドを溶解するための溶媒として使用していた酢酸が、偶然にもヒト GPR41 を活性化することが分かった。ヒト GPR41 遺伝子を発現させたアフリカツメガエルのメラニン保有細胞を用いるアッセイ系で種々の短鎖脂肪酸を評価して、単純短鎖モノカルボン酸が GPR41 を活性化することを明らかにした。さらに、マウス脂肪細胞において短鎖脂肪酸が GPR41 を介してレプチン生成を促進することを明らかにした。

(3) オーフアン受容体GPR103 の内因性リガンドの単離、構造決定及び生理作用³⁷

ラット脳抽出液からオーファン受容体GPR103 の内因性リガンドを単離し、構造決定及び特性評価を行った。このペプチドは、既に 2003 年に武田薬品工業のFukusumi等³⁸ がバイオインフォマティクスによるアプローチから同定しQRFPと命名された 43 アミノ酸残基のペプチドと同一であった。マウスにはヒトGPR103 と相同な2つの受容体(GPR103A, GPR103B)が存在することを明らかにした。また、QRFPのマウス脳内投与実験からQRFPとその受容体GPR103A/Bがマウスの摂食、行動覚醒ならびに血圧や心拍数を制御することを発見した。

³⁵ Kelly MA *et.al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 9942-9947, 2005 (参考文献 29)

³⁶ Xiong YM *et.al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 1045-1050, 2004 (参考文献 30)

³⁷ Takayasu S *et.al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 7438-7443, 2006 (参考文献 31)

³⁸ Fukusumi S, *et.al*, *J Biol Chem*, 278, 46387-46395, 2003(参考文献 32)

(4) GPR109Bのリガンド同定および機能解析³⁹

GPR109B(HM74)は、GPR109Aと高い相同性を示したタンパク質レベルでは 96%の配列同一性(15 アミノ酸が異なる)であるが、GPR109Aがニコチン酸に高い親和性を示すのに対し、GPR109Bのニコチン酸に対する親和性は極めて低いことが報告されている⁴⁰。

GPR109B と CRE-luciferase reporter plasmid を共発現する CHO 細胞を作成し、約 600 の天然物とその関連物質(脂質、アミノ酸、低分子化合物等)についてリガンド活性をスクリーニングした。その結果、D-フェニルアラニンと D-トリプトファンを含む D-アミノ酸およびその代謝産物の D-キヌレニンが、ホスコリン(forskolin)による細胞内の cAMP 濃度の上昇を抑制する作用があることを見出した。

GPR109A はマウス等の齧歯類に相同分子種(orthologues)が存在するが、GPR109B をコードする EST やゲノム断片について検索した結果、GPR109B はヒトおよびチンパンジー以外の哺乳動物に存在しないことが分かった。

さらに、GPR109B の mRNA がヒト好中球に豊富に発現していること、ヒト好中球中の細胞内カルシウム濃度が D-フェニルアラニンおよび D-トリプトファンにより一時的に増加するが、cAMP 濃度を減少させることを見出した。また、GPR109B を発現させた Jurkat 細胞(ヒト T 細胞由来細胞株)が、D-フェニルアラニンおよび D-トリプトファンにより遊走反応を誘導されることが分かった。これらの結果より、これらの芳香族 D-アミノ酸が GPR109B の活性化を経て、ヒト好中球の遊走反応を引き起こすことが示唆された。

1.3.3 代謝調節

(1) 肥満関連インスリン抵抗性における膵β細胞適合に関与する転写因子SOX6の発見⁴¹

インスリン分泌が増加した膵 β 細胞と通常の β 細胞の遺伝子発現量を DNA マイクロアレイで比較することで発現変動する遺伝子を抽出し、その中から転写因子 SOX6 がインスリン分泌に関与する遺伝子であることを発見した。SOX6 がインスリン自体の発現を抑制する他に、ブドウ糖の代謝を阻害することでブドウ糖依存的なインスリン分泌を抑制すること、さらに、SOX6 が転写因子でありながら DNA 結合によらず、別な転写因子 PDX1 に結合して、その機能を阻害することが明らかになった。

³⁹ Irukayama-tomobe Y *et.al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 3930-3934, 2009 (参考文献 33)

⁴⁰ Wise A *et.al*, *J Biol Chem*, 278, 9869-9874, 2003 (参考文献 34)

⁴¹ Iguchi H *et.al*, *J Biol Chem*, 280, 37669-37680, 2005 (参考文献 35)

(2) オープン核内受容体PPAR δ に関する研究⁴²

核内受容体 PPAR δ に特異的なアゴニスト GW501516 を用いた DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析から、PPAR δ が脂肪酸輸送、 β 酸化およびミトコンドリア呼吸に関与している遺伝子を調節することにより脂肪酸酸化をコントロールしていることが分かった。また、高脂肪食誘導性肥満マウスへのアゴニスト投与実験から、PPAR δ が骨格筋における脂肪酸の β 酸化へのプログラムを調節する上で重要な働きをしていて、PPAR δ の活性化により肥満やインスリン抵抗性が改善されることを明らかにした。以上のことから、PPAR δ はメタボリックシンドローム改善のための治療薬として創薬の良いターゲットになることが示唆された。

(3) アセチル-CoA合成酵素 2 の転写調節機構の解明と遺伝子欠損マウスの作成・解析⁴³

骨格筋や心筋に局在しているアセチル-CoA 合成酵素 2(AceCS2)遺伝子の欠損マウスを作成し、その解析の結果から AceCS2 遺伝子の発現が転写因子 KLF15 により制御されていることが明らかになった。

(4) LDL受容体関連タンパクLRP5 に関する研究⁴⁴

LDL 受容体関連タンパク質5 (LRP5) 遺伝子の欠損マウスを作成し、それらマウスを用いた高脂肪食下での実験から、LPR5 遺伝子欠損により肝臓でのカイロミクロソームのクリアランスが減少して血漿中のコレステロールが上昇すること、さらに、LPR5 遺伝子欠損マウスの膵島では Wnt-3a 刺激によるインスリン分泌が欠如することが分かり、Wnt/LPR シグナル伝達系が膵島におけるグルコース誘導のインスリン分泌に関与していることが示唆された。

(5) USAG-1(Uterine Sensitization Associated Gene-1)の機能⁴⁵

USAG-1 が骨形成タンパク質(BMP)のアンタゴニストとして作用し、USAG-1 をブロックすることで腎障害を軽減できることを見出した。

本プロジェクト終了後、本研究テーマは研究メンバーの柳田素子(現職:京都大学次世代研究者育成センター「白眉プロジェクト」特定准教授)に引き継がれている。

⁴² Tanaka T *et.al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 15924-15929, 2003 (参考文献 36)

⁴³ Yamamoto J *et.al*, *J Biol Chem*, 279, 16954-16962, 2004 (参考文献 37)

⁴⁴ Fujino T *et.al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 229-234, 2003 (参考文献 38)

⁴⁵ Yanagida M *et.al*, *J Clin Invest*, 116, 70-79, 2006 (参考文献 39)

(6) SOX6 のCyclinD1 プロモーター活性抑制による膵β-細胞の増殖の下方制御⁴⁶

転写因子 SOX6 のインシュリン耐性への寄与を調べるために、インシュリン分泌細胞の INS-1E 及び NIH-3T3 細胞を使い、これらの細胞増殖に対する SOX6 の関与について検討した。その結果、SOX6 はβ-カテニン(β-catenin)及び HDAC1(histone deacetylase 1)と相互作用してサイクリン D1(cyclin 1)活性を抑制することが明らかになり、SOX6 が肥満に関連したインシュリン耐性における重要な因子であることが示唆された。

⁴⁶ Iguchi H *et.al*, *J Biol Chem*, 282, 19052-19062, 2007 (参考文献 40)

第2章 プロジェクト終了から現在に至る状況

2.1 各研究テーマの現在の状況

2.1.1 オレキシンの機能・生理作用

(1) 睡眠と覚醒

- ① 外因性のムスカリン受容体を使用する薬理遺伝学的手法であるDREADDシステム (*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*)を使って、人工リガンド(CNO: clozapine-N-oxide)でオレキシニューロンを活性化すると、覚醒量が増えて、睡眠量が減少することを明らかにした⁴⁷。
- ② ヒトでグリシン摂取により良く眠れることが報告されているが、マウスにおいてグリシンが覚醒/睡眠にどのように影響するかについては不明であった。マウスにおいてグリシンがオレキシニューロンを制御していることを明らかにした。オレキシニューロンのグリシン作動性阻害が生理的な睡眠の制御にある役割を持っていることが示唆された⁴⁸。
- ③ 2つのオレキシニン受容体(OX1R, OX2R)のノックアウトマウスを使って、それぞれの受容体が睡眠/醒状態にどのような影響を与えるかを詳細に調べた⁴⁹。
- ④ オレキシニン産生神経細胞に特異的にCre リコンビナーゼ⁵⁰を発現させ、オレキシニン産生神経においてGABA受容体が特異的に欠損するマウスを作成した。このマウスでは明確な睡眠の分断化がみられたことより、オレキシニン産生神経におけるGABA入力が睡眠の安定性に大きく寄与していることを明らかにした⁵¹。

⁴⁷ Sakai K *et.al*, *PLoS ONE*, 6, e20360, 2011 (参考文献 41)

⁴⁸ Hondo M *et.al*, *PLOS ONE*, 6, e25076, 2011 (参考文献 42)

⁴⁹ Mieda M *et.al*, *J.Neuroscience*, 31, 6518-6526, 2011 (参考文献 43)

⁵⁰ バクテリオファージ P1 由来の I 型トポイソメラーゼで、DNA の部位特異的組換えを触媒する。

⁵¹ Matsuki T *et.al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 4459-4464, 2009 (参考文献 44)

(2) エネルギーバランス/摂食行動/肥満

① 視床下部のオレキシンが非常に強く食欲を促進するにも関わらず、ヒトやマウスではオレキシン欠損は肥満を伴うことが分かっている。しかし、オレキシンのシグナル増強が持続した場合のエネルギー恒常性に対する影響は十分に解明されていない。オレキシンの代謝への影響を調べるために、オレキシン過剰発現のトランスジェニックマウスを用いて実験を行い、OX1RよりもOX2Rのシグナル亢進が負エネルギー恒常性およびレプチン感受性の改善を介して食餌誘導性のメタボリックシンドロームに対する耐性をもたらすことを明らかにした⁵²

② オレキシンを含有する視床下部の神経は、動機付け行動や覚醒の間は活性化されている。マウスやラットを用いて、視床下部腹内側部(VMH)へのオレキシンAの注入が骨格筋や脂肪組織のグルコース吸収およびグリコーゲン合成へ与える影響について調べ、VMHのオレキシンおよびその受容体が、筋肉の交感神経と β_2 アドレナリン作動性神経を活性化することにより、骨格筋におけるグルコース代謝の制御において重要な役割を持っていることを明らかにした⁵³。

③ グレリンは摂食行動に関係するオレキシン作動性のホルモンである。グレリンが摂食行動の過剰恒常性の快楽的側面を制御できるかを調べるために実験を行い、グレリンはオレキシン依存的に高脂肪食の報酬価を増加させることを明らかにした⁵⁴。

④ オレキシンノックアウトマウスを用いて、オレキシン欠乏がシヨ糖液吸収、自発運動およびシヨ糖液の選択性に与える影響を調べた。その結果、オレキシン欠乏が摂食量を変えずに満腹閾値を低下させて、シヨ糖摂取量を減少させることを明らかにした⁵⁵。

(参考資料):オレキシン産生神経の入出力系

本プロジェクトにおける「オレキシン系の生理作用」の全体像を理解するための参考資料として、図4に桜井の論文⁵⁶から引用した模式図を示した。

⁵² Funato *et.al*, *Cell Metbolism*, 9, 64-76, 2009 (参考文献 45)

⁵³ Schiuchi *et.al*, *Cell Metabolism*, 10, 466-480, 2009 (参考文献 46)

⁵⁴ Perello *et.al*, *Biol Psychiatry*, 67, 880-886, 2010 (参考文献 47)

⁵⁵ Matsuo *et.al*, *J. Mol., Neuroscience*, 43, 217-224, 2011 (参考文献 48)

⁵⁶ 桜井、蛋白質・核酸・酵素, 52,1840-1848,2007 (参考文献 49)

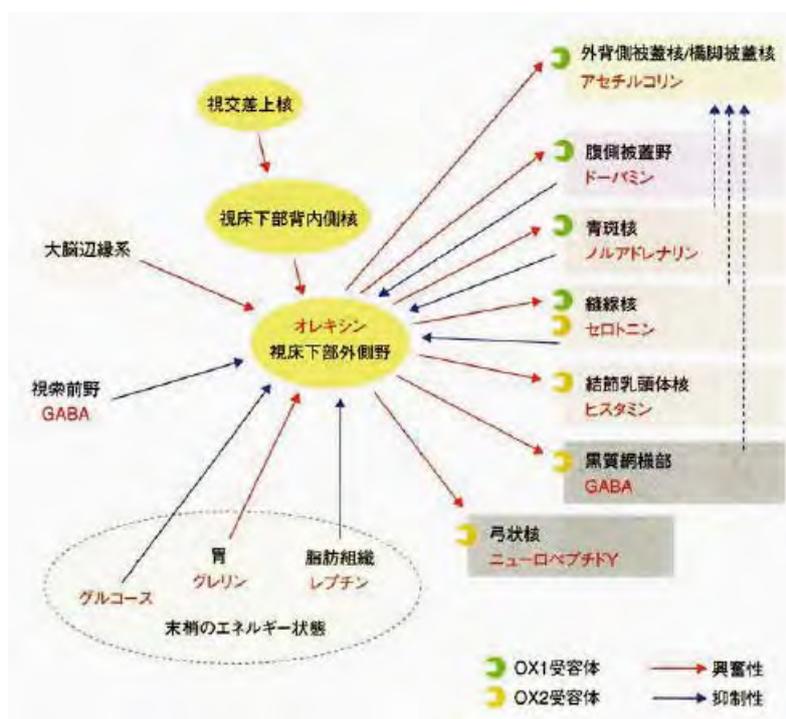


図 4 オレキシン産生神経の入出力系

オレキシン産生ニューロンの細胞体は視床下部外側野のみに局限しているが、しかし、小脳をのぞく中枢神経系の全域にわたって投射している。脳幹のモノアミン作動性神経、コリン作動性神経、視床の室傍核など、覚醒・睡眠機構に関与する部分にはとくに強い投射が見られる。これらの領域には強いオレキシン受容体(OX1R、OX2R)の発現が観察される。オレキシンは、大脳辺縁系から情動にかかわる情報、視床下部背内側核(DMH)を介して脳内時計からの入力、レプチン、グルコース、グレリンなど末梢のエネルギーバランスに関わる情報をうけ、脳幹や視床下部のモノアミン/コリン作動性神経に出力している。同時に、弓状核(Arc)のNPY神経などを介して摂食行動も制御している。DMHからの入力は食餌同期性の行動リズムにも関与している。Arcへの作用はレプチン感受性の制御にも関与する一方、オレキシンニューロンは、大脳辺縁系や視索前野、脳幹、視床下部などからの入力を得て活性を変化させ、モノアミン系など、覚醒に影響を与える系に出力している。この機能により生体内外の環境に応じて適切な覚醒状態を維持している。

(3) 他の研究分野への展開

① OX2R アゴニストの開発

現在、柳沢は筑波大とテキサス大学の研究室において、それぞれ、大学の有機合成の研究者と連携してメディシナルケミストリー的なアプローチでOX2Rの低分子化合物アゴニストの探索

を進めている。2009年にOX2Rの低分子化合物アゴニストの米国特許⁵⁷を出願しているが、未だ論文は発表されていない。

ナルコレプシーの患者のオレキシン系の異常は、95%がリガンドのオレキシン産生の消失であり、残りは原因が不明であるが、受容体遺伝子の異常は検出されていない。したがって、OX2Rアゴニストはオレキシン産生が欠如したナルコレプシーの治療薬として期待される。

② FIRST（最先端研究開発支援プログラム）の研究テーマ

柳沢は、FIRSTの研究テーマの中で、オレキシンから派生したテーマで睡眠という切り口で睡眠/覚醒に関係する遺伝子を全てスクリーニングしようということで、週60~80匹のマウスの精子にニトロソウレアで数十カ所にランダム点突然変異を起こさせる遺伝子学的な研究を行っている。その点突然変異を起こさせたマウスの脳波を全数測定して睡眠/覚醒に異常があるマウスを見つけるもので、全部で5,000~10,000匹のマウスを取り扱う大規模な研究を進めている。

2.1.2 オーフアン GPCR の機能・生理作用

(1) GPR7 の機能・生理作用

① GPR7 ノックアウトマウスの行動解析⁵⁸

本プロジェクトで得られたオーファン受容体 GPR7 のノックアウトマウスの行動解析を行い、GPR7 は物理的および社会的なストレスに対する扁桃体 (amygdala) の機能制御において重要な役割をもっていることを明らかにした。

GPR7(NPBWR1) のノックアウトマウスをもちいる居住者-侵入者テスト (resident-intruder test: 居住者のマウスがいるケージに訪問者のマウスを入れ、居住者の訪問者に対する攻撃性を評価する試験方法) の結果から、居住者の GPR7 欠損マウスは野生型の侵入者マウスに対する最初の接触までの時間が短く、また接触時間が長いこと、また、テストの間、執拗に追尾行動をするという特徴を示すことがわかり、GPR7 欠損マウスは他のマウスとの接触に対する社会性に異常があることが示唆された。

⁵⁷ US 2010/0150840 A1 (Filed: Jun. 4, 2009) (参考文献 50)

⁵⁸ Nagata-Kuroiwa R *et al*, *PLoS ONE*, 6, e16792, 2011 (参考文献 51)

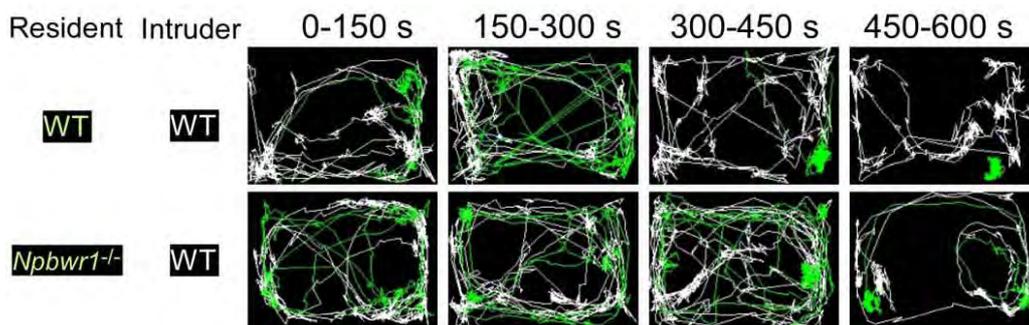


図 5 resident-intruder test におけるビデオ追尾システムの画像 (10 分間撮影)

緑色が居住者 (Resident)、白色が侵入者 (Intruder) を示す。野生型の居住者および侵入者の場合と異なり、居住者の GPR7 欠損マウスが持続的で執拗な接触および追尾行動をしめすことが分かる。また、GPR 欠損マウスの軌跡が訪問者のそれと非常に似通っていることは、執拗な追尾を反映している。

また、音による条件刺激とフットショックの嫌悪刺激を条件付けした後、フリージング反応を評価する恐怖条件付け文脈学習テスト (cued and contextual fear conditioning test) において、GPR7 欠損マウスは恐怖条件付け期間中のフリージング割合が野生型に比べて著しく低いことが分かった。

以上のことから、オーファン受容体 GPR7 はストレス、恐怖、脅威に対して適切な行動をとる等のマウスの生存に当たっての情動記憶や他のマウスとの接触に対する社会性行動において重要な役割を持っていることを明らかにした。

② ヒトにおける GPR7 の機能解析 (遺伝子多型)⁵⁹

ヒトにおける GPR7 (NPBWR1) の機能を調べるためにヒト被験者における遺伝子多型を検索した結果、アミノ酸置換を伴う機能低下型の SNP が存在することが分かった。この多型は、GPR7 の cAMP 産生抑制能を低下させることが明らかになり、ヒトの情動の生成にも影響を与えている可能性が示唆された。各遺伝子型の被験者を集めて、顔表情認知課題を用いた機能的 MRI (fMRI) 試験を行い、扁桃体の活動を局所血流中の還元型ヘモグロビンの割合の減少と関連する BOLD 信号 (Blood Oxygenation Level-Dependent Signal) で評価を行った結果、404T (404 スレオニン) 型の SNP をもつヘテロ接合体の被験者は、404A/A (404 アラニン/アラニン) ホモ型の被験者と明らかに違う応答性を示すことが分かった。また、404A/T ヘテロ型の被験者はどの表情の提示に対しても、404A/A 型よりも大きな BOLD 信号の増加が認めら

⁵⁹ 科学研究費補助金研究成果報告書「扁桃体機能、情動に関わる新規神経ペプチドとその生理作用の解明」 (課題番号: 20020010) より引用

<http://kaken.nii.ac.jp/pdf/2010/seika/mext/13301/20020010seika.pdf> (参考文献 52)

れ、また恐怖との差が見られた。このことから GPR7 はヒトの表情認知にともなう扁桃体の活動性にも大きな影響をもっていることが示唆された。

本研究の成果については、現在論文投稿準備中である。

なお、fMRIによる顔表情認知 (facial affect) と扁桃体 (amygdala) の関連性については、シカゴ大学のFitzgerald等が 6 種類の顔表情写真 (恐怖、怒り、悲しみ、嫌悪、ニュートラル、喜び) を使って実験を行い、ヒトが顔表情を認知する際に扁桃体が活性化することが明らかにされている⁶⁰。

(2) GPR41 の生理作用⁶¹

本プロジェクトの研究成果の中で、短鎖脂肪酸が GPR41 のリガンドであることが明らかにされている。テキサス大学柳沢研究室の本池等は、GPR41 のノックアウトマウスを作成し、その腸管内の微生物叢を野生型と比べて実験を行った。その結果、GPR41 欠損マウスでは腸管運動性の抑制ホルモン (PYY: 腸内分泌細胞由来ホルモン) の発現が減少し、食餌からのエネルギー (短鎖脂肪酸) の吸収が減少することを明らかにした。このことより、GPR41 は腸管微生物に依存して宿主のエネルギーバランスを調節していることが示唆された。

なお、柳沢と本池等が発明者としてワシントン大およびテキサス大学から、肥満防止の用途でGpr41 阻害剤の国際特許が出願されている⁶²。

(3) GPR103B の生理作用

桜井は、本プロジェクトで得られた GPR103B 遺伝子ノックアウトマウスを筑波大から金沢大へ移して GPR103B の機能を解明する研究を行っている。最近、ようやくその行動解析が終わり、これから論文投稿行う予定であるが、論文投稿前であり詳細は不明である。

マウスには GPR103A と GPR103B が存在しているが、ヒトの GPR103 は一つでありマウス GPR103B に近い。マウス GPR103A については手が付けられていない。

(4) GPR109B の生理作用

GPR109B の遺伝子はヒトにのみ存在するため、ノックアウトマウスでの生理作用解析ができず、プロジェクト終了後は研究が進んでいない。今後、サルやマーモット等の霊長類での実験を考える必要があると思われる。

⁶⁰ Fitzgerald DA *et.al*, *Neuroimage*, 30, 1441-1448, 2006 (参考文献 53)

⁶¹ Samuel BS *et.al*, *PNAS*, 105, 16767-16772, 2008 (参考文献 54)

⁶² WO 2010/030997 (参考文献 55)

この受容体は、シグナリングや組織分布がニコチン酸受容体に近いので、高脂血症の治療薬のターゲットになる可能性もある(因みに、ニコチン酸が高脂血症の治療薬になると期待されたが、フラッシングが強く治療薬には到らなかった)。

2.1.3 代謝調節

酒井は、生活習慣病の分子機構の解明のためにプロジェクトの中で行っていた核内受容体の転写調節を中心にエピゲノムとエネルギー代謝について研究を行っている。

(1) 酒井研究室における主な研究テーマ

本プロジェクトの研究の中で、核内受容体の一つである PPAR δ のアゴニストによる活性化により、骨格筋での脂肪の β 酸化が亢進し、高脂肪食による肥満・糖代謝異常を劇的に改善することを示し、PPAR δ が治療薬の標的となることを示した。

また、PPAR δ 研究に加え、PPAR γ の研究も進めており、PPAR γ の標的遺伝子のゲノムワイド解析(ChIP on Chip 法)によりエピゲノムを制御する標的遺伝子の探索を行った結果、PPAR γ によってヒストン H3 の9番目のリジン(H3K9)のメチル化酵素は転写レベルで負に、ヒストン H4 の 20 番目のリジン(H4K20)のモノメチル化酵素 Setd8 は正に制御される遺伝子であることを見出した。そして、H3K9 トリメチル修飾は脂肪細胞分化抑制に、H4K20 モノメチル化は分化促進に働くことを明らかにした。

この結果を、「PPAR γ はこれらのヒストン修飾酵素遺伝子の発現を制御し、さらにこれを介して、脂肪細胞の分化をエピゲノムの角度から制御する新たな経路があること」を論文に発表した⁶³。

その他の研究テーマとして、「プロテオミクスによる脂肪細胞の分化調節機構の解明」及び「核内受容体と Wnt-hedgehog シグナル伝達系の相互作用」の研究を進めている。

さらに、メタボリックシンドロームの治療薬を目指して、民間企業との共同研究により化合物ライブラリーから PPAR δ を活性化するアゴニストの探索を進めている。

(2) 本プロジェクトの中での成果に関連した主な論文

① Okamura T. *et.al*, *PNAS*, 106(14), 5819-5824, 2009

“COUP-TFII acts downstream of Wnt/beta-catenin signal to silence PPAR gene expression and repress adipogenesis”

⁶³ Wakabayashi K *et.al*, *Mol Cell Biol*, 29, 3544-3555, 2009 (参考文献 56)

② Sakakibara I. *et.al*, *Cell Metab.*,9(2), 191-202, 2009

“Fasting-induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking acetyl-CoA synthetase 2”

2.2 プロジェクトメンバーの活動状況

本プロジェクト終了後、酒井は東京大学先端科学技術センター・代謝医学分野の教授となり、桜井は金沢大学医学部分子神経科学・統合生理学研究室の教授となり活躍している。なお、桜井は、平成 23 年 2 月 10 日の総合科学技術会議において「最先端・次世代研究開発支援プログラム」の研究者に選ばれ、「覚醒制御システムのコネクタミクス:睡眠・覚醒制御系の全解明」の研究課題に取り組んでいる⁶⁴。

総括責任者の柳沢は、テキサス大学教授と共に筑波大学大学院人間総合科学研究科の教授を兼務し、平成22年度より、科学技術会議の **FIRST** の中心研究者に選ばれて、5年間の研究期間で研究課題「高次精神活動の分子基盤解明とその制御法の開発」(平成27年まで)に取り組んでいる。

柳田素子研究員は、京都大学次世代研究者育成センター「白眉プロジェクト」において、特任准教授の職を得て、本プロジェクト期間中の成果である USAG-1 の機能解明の研究を継続している。

⁶⁴ http://www8.cao.go.jp/cstp/sentan/jisedai_kettei.html (参考文献 57)

第3章 プロジェクト成果の波及と展望

3.1 科学技術への波及と展望

3.1.1 オレキシン系の機能・生理作用

オレキシン系は、本プロジェクトの成果から、大脳辺縁系において睡眠・覚醒調節だけでなく、情動やエネルギーバランスに応じて、睡眠・覚醒や報酬系および摂食行動を適切に制御する統合的な機能をもつシステムと考えられる。今後、大脳辺縁系におけるオレキシンの神経科学的な制御機構を解明することにより、創薬のターゲットを提供することになると期待される。

また、オレキシン研究で得られた成果が他の研究分野に応用され、新たな研究が生まれることが期待される。そのような研究について、以下に最近の研究動向をいくつか例を挙げて紹介する。

① オレキシン系のアポトーシス(apoptosis)及び癌治療薬への応用に関する研究

・ Voisin等は、OX1R又はOX2Rを発現するCHO細胞を作成し、オレキシンがOX1Rを活性化してアポトーシスを誘導すること、それがオレキシン固有の特性であることを明らかにした^{65,66}。さらに、免疫受容体(immunoreceptors)の特徴の一つと考えられているITIM⁶⁷がOX1Rの1番目の細胞外ループが2番目の膜貫通ドメインに結合している細胞外ドメインに存在すること、オレキシンによるOX1Rの活性化後にSrc様キナーゼによってITIMのチロシンがリン酸化され、チロシンリン酸化酵素 SHP-2 をリクルートして活性化することを明らかにした。

・ 同じ研究グループのFirar等は、OX1Rの1番目の細胞外ドメインに標準的なITSM⁶⁸の配列が存在すること、ITSM中の28番目のチロシン(Y²⁸)をフェニルアラニン(F)に変える変異はOX1R誘導のアポトーシスを消失させるが、オレキシンが誘導するOX1RのG_qタンパク質のカップリングを介するイノシトールリン酸塩形成又は一過性カルシウム濃度上昇(calcium transient)には変化がないこと、さらに、Y⁸³のFへの変異はオレキシン誘導のITSM中のチ

⁶⁵ Voisin T *et.al*, *Endocrinology*, 147, 4977-4984, 2006 (参考文献 58)

⁶⁶ Voisin T *et.al*, *FASEB J.*, 22, 1993-2002, 2008 (参考文献 59)

⁶⁷ Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif. 免疫機能抑制分子に共通のモチーフ。

⁶⁸ Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif. 免疫応答の活性化または抑制性のシグナルを伝達する免疫機能分子に共通のモチーフ。

ロシンリン酸化を消失させるとともに受容体によるSHP-2のリクルートを消失させることを明らかにして、OX1Rに存在するITSM及びITIM中のリン酸化チロシンの空間的認知がSHP-2の2つのSH2ドメインとの相互作用に対応することを示すOX1Rの構造モデルを構築した⁶⁹。

- Voisin等は、一連のヒト大腸癌及び肝臓転移癌中のOX1Rの存在状態を調べ、それらの分布や進行段階に関係なく全ての原発大腸癌、及び評価した全ての転移癌にOX1RのmRNA及び又はタンパク質が発現していることを明らかにした。対照的に、隣接する正常大腸細胞又は肝臓細胞での発現は全く認められなかった。また、原発腫瘍又は転移腫瘍から樹立した9株のヒト大腸癌細胞がOX1Rを発現して、オレキシンAによりアポトーシスが誘導されること、オレキシンAが大腸癌の治療薬として最も使用されている化学療法剤の5-FUに耐性を示す細胞株に対してアポトーシスを誘導することを確認した。さらに、ヌードマウスを用いるヒト大腸癌細胞の移植実験において、移植当日(0日)でのオレキシンA投与により腫瘍の増殖が低下し、移植後7日での投与でも増殖した腫瘍の成長を後退させることが分かった⁷⁰。

以上の結果から、OX1Rのアゴニストが大腸癌の新しい治療薬開発の候補になると考えられる。

② オレキシン系の薬物依存症(drug addiction)に関する研究

最近、オレキシン受容体が薬物依存症(drug addiction)の再発防止の治療薬開発のターゲットとして研究されている⁷¹。De Lecea等は、オレキシンのマウス脳内投与により薬物依存及び摂食行動が濃度依存的に誘導されること、また、ストレスで誘導される薬物依存がOX1Rアンタゴニストでブロックされること、また、オレキシンが腹側被蓋領域(ventral tegmental area)のNMDA型グルタミン酸受容体の動員を介してコカイン感受性に決定的に関わっているという最近の他のデータと組み合わせて、オレキシンニューロンが薬物依存症の進行に重要な役割を果たしていることを明らかにした⁷²。また、J&J Pharmaceuticals社の研究グループは、OX2RアンタゴニストのJNJ-10397049の全身投与によりエタノール報酬効果が遮断されるか、或いはエタノール離脱が逆転されるかを確認するために、OX1RアンタゴニストのSB-408124を対照薬としてラットを用いた実験を行い、JNJ-10397049が濃度依存的にサッカリン自己投与、ドーパミンレベルには変化がなく、また、離脱徴候もなくエタノール自己投与を低下させる

⁶⁹ El Firar A *et.al*, *FASEB J.*, 23, 4069-4080, 2009 (参考文献 60)

⁷⁰ Voisin T *et.al*, *Cancer Research*, 71, 3341-3351, 2011 (参考文献 61)

⁷¹ Zhou L *et.al*, *Pharmaceuticals*, 4,804-821, 2011 (総説) (参考文献 62)

⁷² Boutrel B *et.al*, *Physiol Behav*, 93, 947-951, 2008 (参考文献 63)

こと明らかにした。驚くことに、SB-408124 には、このような効果は認められなかった⁷³。

③ オレキシン系の老人性痴呆症(dementia)に関する研究

アルツハイマー病は、老人性痴呆症の最も一般的な要因であり、アミロイドβ-ペプチド(Aβ)が脳の細胞外に蓄積することが、その発症機序における重要な事象であることが分かっている。Kang等は、ヒトAPP(human amyloid precursor protein)を発現するトランスジェニックマウスを用いて、脳間室液中のAβ濃度変化を測定した。その結果、急性睡眠妨害やオレキシン注入の間はAβレベルが顕著に増加し、一方、OXRアンタゴニストのalmorexantの連続投与によりAβレベルが低下することが分かった。さらに重要なことは、ヒトAPPトランスジェニックマウスのAβプラーク形成が慢性的な睡眠制限により増加し、OXRアンタゴニスト連続投与により減少したことであり、これらの結果から睡眠・覚醒のサイクル及びオレキシンがアルツハイマー病の発症にある役割を果たしていることが示唆される⁷⁴。

④ 摂食により制御される体内時計

本プロジェクトの中でオレキシン系の睡眠調節の研究を進める過程で、マウスの視床下部背内側核における時計遺伝子(period遺伝子)のオン・オフは単純に毎日の摂食に応答しているのではなく、自律的に食餌同期性クロックとして機能し、摂食のタイミングを記憶していて、哺乳動物の行動パターンを25時間周期で制御している体内時計(概日時計)とは異なる、摂食によって制御される体内時計(いわゆる「腹時計」)の存在を明らかにした⁷⁵。

睡眠覚醒や食欲の一日の中での変動は、ヒトにおいてもマウスと同様、「光同期性クロック(概日時計)」と「食餌同期性クロック(腹時計)」とによって支配されている。今後、この腹時計がいかんして摂食によって制御され、また、いかんして食欲・食行動を支配しているのかを解明してゆくための、最初の突破口が開かれたと思われる。腹時計を調節する、あるいは腹時計からの情報を伝える分子を明らかにしていくことで、将来、肥満や生活習慣病を予防する新たな手段が発見されることが期待される。

⁷³ Shoblock JR *et al.*, *Psychopharmacology*, 215, 191-203, 2011 (参考文献 64)

⁷⁴ Kang JE *et al.*, *Science*, 326, 1005-1007, 2009 (参考文献 65)

⁷⁵ Mieda M *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 12150-12155, 2006 (参考文献 66)

3.1.2 GPCR に関する研究

(1) オープン GPCR のリガンド探索

1.1.1. (2).③で述べたように、最近、新しいオープンGPCRリガンド同定に関する論文発表が非常に少なくなっているが、Chung 等がオープンGPCR研究の総説⁷⁶の中で紹介しているように、約360のオープンGPCRの中で未だリガンド不明なGPCRが100近くは存在していると考えられている。

GPCR は多くの疾患に関わっているため、オープン GPCR の内在性リガンドを探索して、その生理作用を明らかにすることにより疾患に関する基礎研究が進歩し、それが新しい治療薬の開発につながることを期待される。今後もオープン GPCR リガンド探索は重要な研究テーマである。

オープン GPCR の中には、単一の受容体(モノマー)で活性を示す場合と他の受容体と複合体(オリゴマー)となって活性を示すものがあり、今後、オリゴマーを形成して活性を示すオープン GPCR のリガンドをハイスループットに効率的に探索するためのアッセイ法の改良が進むと内因性の新規リガンドの発見も増加することが期待される。

例えば、アドレノメデュリン(ADM)は1993年にKangawa等によって発見された降圧ペプチドであるが、その受容体であるADM受容体は、オープンGPCRのカルシトニン受容体様受容体(CRLR)が細胞膜1回貫通タンパク質である受容体活性調節タンパク質(RAMP) 2との複合体として小胞体(endoplasmic reticulum)から細胞膜(plasma membrane)に輸送されて形成され、一方、CRLRがRAMP2と構造的に類似するRAMP1との複合体として小胞体から細胞膜に輸送されると、カルシトニン遺伝子関連ペプチド受容体(CGRP受容体)が形成されることが明らかにされている⁷⁷。すなわち、ADM受容体およびCGRP受容体は、GPCRと膜1回貫通タンパク質とのダイマーとして存在している。図6には、上記の受容体形成を模式的に示した。

⁷⁶ Chung S *et.al*, *British J Pharmacolo*, 153, S339-S346, 2008 (参考文献 67)

⁷⁷ Linda M. McLatchie *et.al*, *Nature*, 393, 333-339, 1998 (参考文献 68)

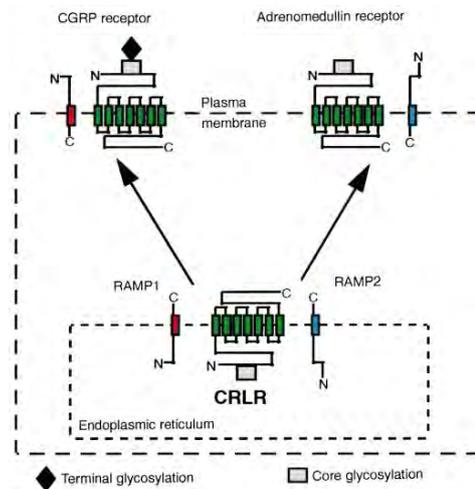


図 6 RAMP1 および RAMP2 が関与する ADM 受容体と CGRP 受容体の形成

(2) GPCR をターゲットにする創薬研究の新しい流れ

① 癌細胞の増殖に関連する GPCR をターゲットにする創薬に関する研究

Lappano等は、癌領域におけるGPCRをターゲットにする創薬に関する総説⁷⁸の中で、癌細胞に存在して増殖や転移に関連するGPCRとして、Lysophosphatidic acid receptors, Shingosine-1-phosphate receptors, Protease-activated receptor 1, Castrin-releasing peptide receptor, Endothelin receptors, Prostaglandin E2 receptors, Bradykinin receptors, CXC chemokine receptor 4, Angiotensin II type 1 receptor,

CXC chemokine receptor 2, Gprotein-coupled oestrogen receptor, Orexin receptor 1, Smoothed, Frizzled の 13 種類を挙げている。今後、リガンド既知の GPCR 及びオーファン GPCR のシグナル伝達機構の解明が進むと、癌細胞の増殖に係る増殖因子の受容体のシグナル伝達機構も明らかになり、選択的な阻害剤による分子標的医薬品の開発につながる事が期待される。

3.1.3 プロジェクト関連の主要論文の被引用件数の推移

本プロジェクト以降に柳沢グループにて発表された論文の中で、WOS で検索した被引用件数の多いものから 10 報について、表 2 に示した。これらの年次別の被引用件数の推移を図 7 に示した。また、①の論文は、トムソン・ロイター社の Essential Science IndicatorSMの分析結果では、Pharmacology&Toxicology 分野において、TOP 0.1%の被引用件数に相当する。

⁷⁸ Lappano R *et.al*, *Nature Reviews*, 10, 47-60, 2011 (参考文献 69)

②、③の論文も TOP 1%に入っており、世界的にみても注目されている論文といえる。

表 2 主要論文リスト

No	書誌事項	被引用件数
①	Okazaki, Y <i>et al.</i> , <i>Nature</i> , 420, 563-573, 2002	693
②	Tanaka T <i>et al.</i> , <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 100, 15924-15929, 2003	369
③	Yamanaka A <i>et al.</i> , <i>Neuron</i> , 38, 701-713, 2003	267
④	Yanagisawa, H <i>et al.</i> <i>Nature</i> , 415, 168-171, 2002	224
⑤	Willie JT <i>et al.</i> , <i>Neuron</i> , 38, 715-730, 2003	170
⑥	Narita M <i>et al.</i> , <i>J Neurosci</i> , 26, 398-405, 2006	159
⑦	Fujino T <i>et al.</i> , <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 100, 229-234, 2003	141
⑧	Mieda M <i>et al.</i> , <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 103, 12150-12155, 2006	115
⑨	Mochizuki T <i>et al.</i> , <i>J Neurosci</i> , 24, 6291-6300, 2004	114
⑩	Georgescu D <i>et al.</i> , <i>J Neurosci</i> , 23, 3106-3111, 2003	113

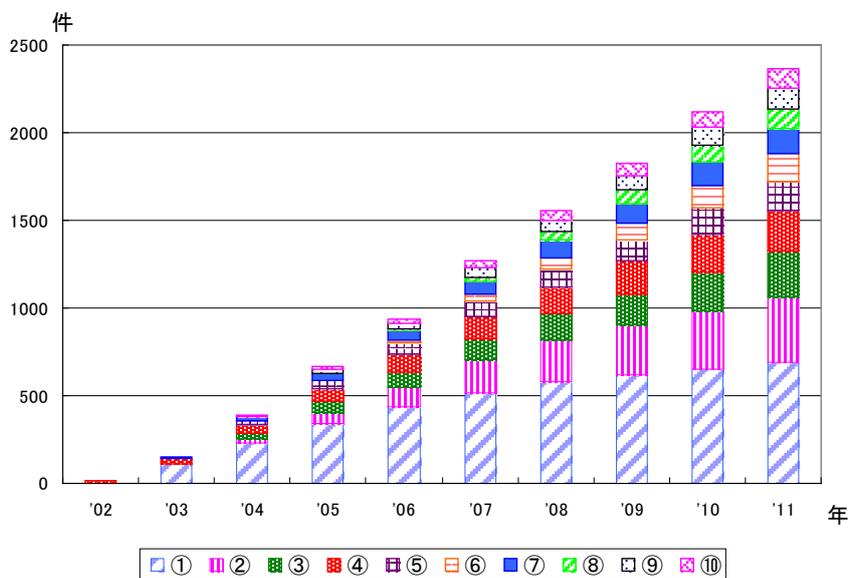


図 7 主要論文被引用件数の年次別推移(累計) 2011/12/12 現在 (WOS)

3.2 社会経済への波及と展望

3.2.1 創薬への応用

オーファン GPCR のリガンド探索により新しいリガンドが発見されると、その生理作用の解明が進められ、その結果を基にアンタゴニスト又はアゴニストが治療薬へ応用されることが期待できる。

現在、ここ約 20 年間に発見されたオーファン GPCR/リガンドに関する生理作用の解明等の基礎研究から生まれた成果を基に世界的にも新しい治療薬の開発が進められている。

以下、現在、臨床段階にある GPCR をターゲットにする治療薬の例をいくつか紹介する。

表 3 臨床段階にある GPCR をターゲットにする治療薬

GPCR	化合物	対象疾患	企業名	臨床ステージ
GPR40	TAK-875 アゴニスト	糖尿病	武田薬品工業	フェーズⅢ
GHR	ヒトグレリン アゴニスト	神経性食欲 不振症	京都大学 アスピオファーマ	フェーズⅢ
OX1R/OX2R	Almorexant アンタゴニスト	原発性不眠症	Actelion	フェーズⅢ
OX1R/OX2R	MK4305 アンタゴニスト	原発性不眠症	Merck	フェーズⅢ
NPY5R	Velneperit アンタゴニスト	肥満症	塩野義	フェーズⅡ
OX1R/OX2R	GSK649868 アンタゴニスト	原発性不眠症	GlaxoSmithKlein	フェーズⅡ
GPR38	GSK962040 アゴニスト	糖尿病	GlaxoSmithKlein	フェーズⅡ
GPR119	PSN821 アゴニスト	肥満症	アステラス	フェーズⅡ
NPY5R	S-234462 アンタゴニスト	肥満症	塩野義	フェーズⅠ
CNR1	TM38837 アンタゴニスト	肥満症	7TM Pharma	フェーズⅠ
MCHR1 (GPR24)	ALB-127158(a) アンタゴニスト	肥満症	Albany Molecular Research	フェーズⅠ
MCHR1 (GPR24)	BMS-830216 アンタゴニスト	肥満症	Bristol-Mayers Squibb	フェーズⅠ
GPR54	メタスチン誘導体 アゴニスト	前立腺癌	武田薬品工業	フェーズⅠ

3.2.2 診断への応用

(1) バイオマーカーとしてのオーファン GPCR の利用

オーファン GPCR のリガンドの中で、生理作用の解明の結果、疾病との関連について相関関係があることが分かれば、バイオマーカーとして診断薬への応用が期待できる。

- Baranowska 等は、食欲やエネルギー代謝の制御に関連するペプチドであるオレキシン A、オレキシン B、レプチン、ニューロペプチド Y (NPY)、インシュリンについて、36 人の肥満女性と 16 名の痩せた女性の血中濃度を RIA 法で測定し、オレキシン A、NPY、レプチンがヒトのエネルギー代謝の制御に関連することを明らかにした⁷⁹。
- Phoenix 社は、グレリン、レプチン、MCH、ニューロメジン U、NPW、オレキシン A 等のペプチド性リガンドを肥満バイオマーカーとして測定するキットを販売。

(2) GPCR の遺伝子多型を利用した疾病診断

既に、GPCR の遺伝子多型と疾病の関係が明らかになっているものがあり、今後、その数も増えていくことが予想され、GPCR 遺伝子の SNP がバイオマーカーとして期待される。

- 本プロジェクトの成果として、ヒト GPR7 に遺伝子多型があり、アミノ酸置換を伴う機能低下型の SNP が存在することが明らかになっている。この多型は、受容体の cAMP 産生抑制能を低下させ、ヒトの情動の生成にも影響を与えている可能性があり、GPR7 遺伝子の SNP がバイオマーカーとして期待される。

(3) 癌細胞の増殖に関連する GPCR の細胞診断

外科手術で摘出した腫瘍細胞又はバイオプシで得られた腫瘍細胞の表面に発現した GPCR を迅速に測定して、原発腫瘍の転移性を判定する診断薬の開発が期待される。

- Ingol 等は、遺伝子アレイ技術を用いてリンパ節転移の陽性及び陰性の腸型胃癌患者における GPCR 特異的な発現解析を行い、52 種の GPCR 及び GPCR 関連遺伝子を同定した。また、RT-PCR を用いて、種々な胃癌サンプル中のケモカイン CXCL12⁸⁰ とその GPCR 受容体

⁷⁹ Baranowska B *et.al*, *Neuroendocrinology letters*, 26, 293-296, 2005 (参考文献 70)

⁸⁰ CXCL12; chemokine(C-X-C motif) ligand 12 (stroma cell-derived factor 1)

CXCR4-mRNAの特異的な発現解析を行った。これらの結果から、腫瘍細胞中でCXCL12、周辺の微小血管中でCXCR4を発現している腫瘍が、局所的な腫瘍の成長(転移)とUICCステージ⁸¹と良く関連することを明らかにした⁸²。

以上の結果から、RT-PCR等の遺伝子解析技術を用いて、原発腫瘍のGPCR及びそのリガンドについて調べることにより、腫瘍の転移性や病期のステージ等の診断に応用することが期待される。

(4) オレキシン測定によるナルコレプシー補助診断への応用

本プロジェクトの直接の波及効果ではないが、2005年、米国睡眠学会による「睡眠障害国際分類第2版(ICSD-2)」のナルコレプシー補助診断基準に「髄液のオレキシン値の低下」が採用されたことは、オレキシン系の生理作用に関する柳沢グループの先駆的な研究を切っ掛けとしてから色々な研究者がオレキシンに取り組むようになった成果と考えられる。

我が国では、秋田大学医学部精神科(神林 崇准教授)が、患者の希望によりナルコレプシーの診断を確定するために、脳髄液中のオレキシン測定を無料で実施している。

⁸¹ 国際対がん連合が作成した癌の進行度を表す病期分類。

⁸² Ingold B *et.al*, *PLoS ONE*, 5, e10087, 2010 (参考文献 71)

参考表

同定されたオーファンGPCRとそのリガンド(Wise等⁸³のリストを補充追加)

	オーファン GPCR	リガンド	発表年	文 献
1	BRS-3	Bombesin	1993	Fathi <i>et.al</i> , JBC, 268, 5979-5984, 1993
2	ORL-1	Nociceptin/OrphaninFQ	1995	Meunier <i>et.al</i> , Nature, 377, 532-535, 1995
3	AZ3B	C3a	1996	Ames <i>et.al</i> , JBC, 271, 20231-20234, 1996
4	EDG3/SIPR3		1997	An S. <i>et.al</i> , FEBS Lett.,417, 279-282, 1997
5	Orexin-1 and -2	Orexin-A /B	1998	Sakurai <i>et.al</i> , Cell, 92, 573-585, 1998
				de Lecea <i>et.al</i> , PNAS, 95, 322-327, 1998
6	GRP10/hGR3	PRP		Hinuma <i>et.al</i> , Nature, 393-272-276, 1998
7	APJ	Apelin		Takemoto <i>et.al</i> , BBRC, 251, 471-476, 1998
8	CRLR	CGRP		McLatchie <i>et.al</i> , Nature, 393, 333-339, 1998
9	EDG1/S1PR1	S1P		Lee <i>et.al</i> , Science, 279, 1552-1555, 1998
10	EDG2/LPA1	LPA		Erickson <i>et.al</i> , JBC,273, 1506-1510,1998
11	EDG-4/LPA2	LPA		Bleu <i>et.al</i> , JBC,273, 7906-7910, 1998
12	EDG5/S1PR2	S1P	1999	Brocklyn <i>et.al</i> , JBC, 274, 4626-4632, 1999
13	KIAA0001	UDP-glucose		Chambers <i>et.al</i> , JBC, 275, 10767-10771, 1999
14	GHS-R	Ghrelin		Kojima <i>et.al</i> , Nature, 402, 656-660, 1999
15	GRP14	UrotensinII		Mori <i>et.al</i> , BBRC, 265, 123-129, 1999
				Ames <i>et.al</i> , Nature, 401, 282-286, 1999
16	HG57(Cys-LTIR)	LTD4		Lynch <i>et.al</i> , Nature, 399, 789-793, 1999
17	GPR38	Motilin		Feighner <i>et.al</i> , Science, 284, 2184-2188
18	GPR24/SLC-1	MCH		Shimomura <i>et.al</i> , BBRC, 261, 622-626, 1999
19	HMTMF81	Cys-LTs		Sarau <i>et.al</i> , Mol. Pharmacol., 56, 657-663, 1999
20	RUP7	Histamine		EP1133559A2,Oct.3, 1999
21	GALR2	GALP		Ohtaki <i>et.al</i> , JBC, 274, 37041-37045, 1999
22	BG3	Histamine	2000	PCT/JP00/01826, Mar.24, 2000
23	EDG7/LPA3	LPA		Heise <i>et.al</i> , Mol. Pharmacol., 57, 753-759, 2000
24	OGR-1	SPC		Zhu <i>et.al</i> , Nat.Cell.Biol., May 2(5), 261-267, 2000
25	EDG6/S1PR4	S1P		Yamazaki <i>et.al</i> , BBRC, 268, 583-589, 2000
26	EDG8/S1PR5	S1P		Dong-Soon Im <i>et.al</i> , JBC, 275, 14281-14286, 2000
27	PSECO146	LTB4		Takasaki <i>et.al</i> , BBRC, 274, 316-322, 2000

⁸³ Wise *et.al*, *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 44, 43-66, 2004 (参考文献 9)

28	FM-3(TGR-1)	Neuromedin U		Hosoya <i>et.al</i> , JBC, 275, 29528-29532, 2000
29	SNORF33	Tryptamine		PCT WO/00/73449, Dec.7, 2000
30	HH4R/ GGPRv53 / AXOR35 / GPR105	Histamine	2000	Nakamura <i>et.al</i> , BBRC, 279, 615-620,2000 Zhu <i>et.al</i> , Mol. Pharmacol., 59, 434-441, 2001 Liu <i>et.al</i> , Mol. Pharmacol. 59, 420-426, 2001 Morse <i>et.al</i> , J.Pharmacol.Exp.Ther.,296, 1058, 2001
31	HLWAR77	Neuropeptides		Elshourbagy <i>et.al</i> , JBC, 275, 25965-25971, 2000
32	OT7T022	RFRP		Hinuma <i>et.al</i> , Nat.Cell Biol. Oct2(10),703-708, 2000
33	CRTH2	PG-D2	2001	Hirai <i>et.al</i> , J.Exp.Med., 193, 255-261, 2001
34	OT7T175(GPR54)	Metastin /KiSS-1		Ohtaki <i>et.al</i> , Nature, 411, 613-617, 2001 Kotani <i>et.al</i> , JBC, 276, 34631-34636, 2001
35	G2A	LPC		Kabarowski <i>et.al</i> , Science, 293, 702-705, 2001
36	P2Y12	ADP		Hollopeter <i>et.al</i> , Nature, 409, 202-207, 2001
37	MCH2	MCH		Hill <i>et.al</i> , JBC, 276, 20125-20129, 2001
38	TDAG-8	Psychosine		Heise <i>et.al</i> , J.Cell Biol.,153, 429-434, 2001
39	GPR4	SPC		Zhu <i>et.al</i> , JBC, 276, 41325-41335, 2001
40	GPR44	PGD2		Hirai <i>et.al</i> , J.Exp.Med., 193, 255-261, 2001
41	GRP86	ADP		Communi <i>et.al</i> , JBC, 276, 41479-41485, 2001
42	SP1999	ADP		Foster <i>et.al</i> , J.Clin. Invest., 107, 1591-1598, 2001
43	TG1019/R527	Eicosanoids	2002	Hosoi <i>et.al</i> , JBC, 277, 31459-31465, 2002 Jones <i>et.al</i> , Mol. Pharmacol., 63, 471-477, 2002
44	LGR7 /LGR 8	Relaxin		Nakabayshi <i>et.al</i> , Science, 295, 671-674, 2002
45	GPR77	C5a		Cain <i>et.al</i> , JBC, 277, 7165-7169, 2002
46	ZAQ/15E	Prokineticins		Masuda <i>et.al</i> , BBRC, 396-402, 2002
47	GPR7	NPB/NPW		Shimomura <i>et.al</i> , JBC, 277, 35826-35832, 2002 Fujii <i>et.al</i> . JBC, 277, 34010-34016, 2002
48	GPR8	NPB/NPW		Shimomura <i>et.al</i> , JBC, 277, 35826-35832, 2002 Fujii <i>et.al</i> . JBC, 277, 34010-34016, 2002
49	TGR5	Bile acid		Murayama <i>et.al</i> , BBRC, 298, 714-719, 2002 Kawamata <i>et.al</i> , JBC,278, 9435-9440, 2003
50	GPR41	FFA	2003	Nilsson <i>et.al</i> , BBRC, 303, 1047-1052, 2003 Brown <i>et.al</i> , JBC, 278, 11312-11319, 2003
51	GPR42	FFA		Brown <i>et.al</i> , JBC, 278, 11312-11319, 2003

52	SNSR3	BAM22		Nilsson <i>et.al</i> , BBRC, 303, 1047-1052, 2003
53	GPR43	FFA		Brown <i>et.al</i> , JBC, 278, 11312-11319, 2003
54	HM74A/GPR109A	Nicotinic acid		Tunaru <i>et.al</i> , Nat. Med, 9, 352-355, 2003
55	GPR40	FFA		Briscoe <i>et.al</i> , JBC, 278, 11303-11311, 2003
				Itoh <i>et.al</i> , Nature, 422, 173-176, 2003
				Kotarsky <i>et.al</i> , BBRC, 301, 406-410, 2003
56	MAS	Angiotensin1-7		Santos <i>et.al</i> , PNAS, 100, 8258-8263, 2003
57	OGR1/ GPR4	Proton-sensing		Ludwig <i>et.al</i> , Nature, 425, 93-98, 2003
58	GPR103/AQ27	QRFP		Fukusumi <i>et.al</i> , JBC, 278, 46387-46395, 2003
59	TGR7	β -alanine	2004	Shinohara <i>et.al</i> , JBC, 279, 23559-23564, 2004
60	FM-4/TGR-1	Neuromedin S	2005	Ida <i>et.al</i> , Endocrinology, 146, 4217-4223, 2005
61	GPR119	LPC		Soga <i>et.al</i> , BBRC, 326, 744-751, 2005
62	RDC1/CXCR7	CXCL-12		Balabanian <i>et.al</i> , JBC, 280, 35670-35766, 2005
63	GPR120	FFA		Hirasawa <i>et.al</i> , Nat. Med., 11, 90-94,2005
64	GPRC6A	L- α -amino acids (L-Arg, L-Lys, L-ornithine)		Wellendorph <i>et.al</i> , Mol Pharmacolo 67, 589-597,2005
65	GPR17	Uracil nucleotides	2006	Ciana <i>et.al</i> , EMBO J. 25, 4615-4627, 2006
66	GPR18	N-arachidonylglycine		Kohno <i>et.al</i> , BBRC, 347, 827-832, 2006
67	GPR34	lysoPS		Sugo <i>et.al</i> , BBRC, 341, 1078-1987, 2006
68	GPR35	Kynurenic acid		Wang <i>et.al</i> , JBC, 281,22021-22208, 2006
69	GPR75	RANTES		Ignatov <i>et.al</i> , Br. J. Pharmacolo. 149, 490-497,2006
70	GPR84	Medium-chain FFA		Wang <i>et.al</i> , JBC, 281, 34457-34464, 2006
71	GPR92	LPA		Kotarsky <i>et.al</i> , J Pharmacol Exp Ther, 318,619-628,2006
72	GPR55	Cannabinoid		Ryberg <i>et.al</i> , Br J Pharmacolo, 152, 1092-1101, 2007
73	GPR87	LPA	2007	Tabata <i>et.al</i> , BBRC, 363, 861-866, 2007
74	GPR1	Chemerin	2008	Gilad <i>et.al</i> , PNAS, 105, 64-69, 2008
75	P2Y10	S1P		Murakami <i>et.al</i> , BBRC, 371, 707-712, 2008
76	P2Y5	LPA		Pasternack <i>et.al</i> , Nat. Genet., 40,329-334, 2008
77	GPR109B	Aromatic D-AA	2009	Irukayama <i>et.al</i> , PNAS, 3930-3934, 2009

※注

LPA:	Lysophosphatidic acid	S1P:	Sphingosin-1-phosphate
------	-----------------------	------	------------------------

FFA:	Free Fatty acid	lysoPS:	Lysophosphatidylserine
PGD2:	Prostaglandin D2	LPC:	Lysophosphatidylcholine
ADP:	Adenosine diphosphate	D-AA:	Aromatic D-amino acids
RANTES:	Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted :T細胞由来の好酸球走化性物質		
CGRP:	Calcitonin gene-related peptide	CRLR:	Calcitonin receptor-like receptor
CXCL12:	ケモカイン	SPC:	Sphingosylphosphorylcholine

参考文献

No	書誌事項
1	Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB, “Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro”, <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 70, 3240-3244, 1973
2	US 4,237,224
3	Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N, “Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia”, <i>Science</i> , 230, 1350-1354, 1985
4	Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA, “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase”, <i>Science</i> , 239, 487-491, 1988
5	Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ, Strader CD, “Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin”, <i>Nature</i> , 321, 75-79, 1986
6	Libert F, Parmentier M, Lefort, A, Dinsart C, Sande JV, Maenhaut C, Simons MJ, Dumont JE, Vassart G, “Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family”, <i>Science</i> , 244, 569-572, 1989
7	http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ReceptorFamiliesForward?type=GPCR
8	Wise A, Jupe SC, Rees S, “The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors”, <i>Annu Rev Pharmacol Toxicol</i> , 44, 43-66, 2004
9	Vilardaga JP, Agnati LF, Fuxe K, Ciruela F, “G-protein-coupled receptor heteromer dynamics”, <i>J Cell Sci</i> , 123, 4215-4220, 2010
10	Skrabanek L, Murcia M, Bouvier M, Devi L, George SR, Lohse MJ, Milligan G, Neubig R, Palczewski K, Parmentier M, Pin JP, Vriend G, Javitch JA, Campagne F, Filizola M, “Requirements and ontology for a G protein-coupled receptor oligomerization knowledge base”, <i>BMC Bioinformatics</i> , 8, 177, 2007
11	Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JRS, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M, “Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior”, <i>Cell</i> , 92, 573-585, 1998

12	Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong YM, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M, "Narcolepsy in orexin knockout mice: Molecular genetics of sleep regulation", <i>Cell</i> , 98, 437-451, 1999
13	http://www.jpma.or.jp/medicine/genome/specialist/int/int002_2.html
14	http://www.takeda.co.jp/pdf/usr/default/12_2_47242_2.pdf
15	http://www.smr.org.uk/smr/Archive/PastMeetings/Downloads/20020307.pdf
16	http://www.discoverx.com/about/about-press.php
17	http://www.businesswire.com/news/home/20110414007137/ja/
18	http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ghrelin/html/rinsho.html
19	Willie J.T., Chemell R.M., Sinton C.M., Tokita S., Williams S.C., Kisanuki Y.Y., Marcus J.K., Kohlmeler K.A., Leonard C.S., Richardson J.A., Hammer R.E., Yanagisawa M., "Distinct Narcolepsy Syndromes in Orexin Receptor-2 and Orexin Null Mice: Molecular Genetic Dissection of Non-REM and REM Sleep Regulatory Processes" <i>Neuron</i> , 38, 715-730, 2003
20	Mochizuki T, Crocker A, McCormack S, Yanagisawa M, Sakurai T, Scammell T, "Behavioral State Instability in Orexin Knock-Out Mice", <i>J.Neurosci.</i> , 24, 6291-6300, 2004
21	Matsuzaki I, Sakurai T, Kunii K, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K, "Involvement of the serotonergic system in orexin-induced behavioral alterations in rats", <i>Regulatory Peptides</i> , 104, 119-123, 2002
22	Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T, "Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice", <i>Neuron</i> , 38, 701-713, 2003
23	Kayaba Y, Nakamura A, Kasuya Y, Ohuchi T, Yanagisawa M, Komuro I, Fukuda Y, Kuwaki T, "Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice", <i>Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol</i> , 285, R581-R593, 2003
24	Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, Kageyama H, Kunita S, Takahashi S, Goto K, Koyama Y, Shioda S, Yanagisawa M, "Input of orexin/hypocretin by a genetically encoded neurons revealed tracer in mice", <i>Neuron</i> , 46, 297-308, 2005
25	Muroya S, Funahashi H, Yamanaka A, Kohno D, Uramura K, Nambu T, Shibahara M, Kuramochi M, Takigawa M, Yanagisawa M, Sakurai T, Shioda S, Yada T, "Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y/POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca ²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus", <i>Eur J Neurosci</i> , 19, 1524-1534, 2004

26	Tanaka H, Yoshida T, Miyamoto N, Motoike T, Kurosu H, Shibata K, Yamanaka A, Williams SC, Richardson JA, Tsujino N, Garry MG, Lerner MR, King DS, O'Dowd BF, Sakurai T, Yanagisawa M, "Characterization of a family of endogenous neuropeptide ligands for the G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 100, 6251-6256, 2003
27	Shimomura Y, Harada M, Goto M, Sugo T, Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T, Asami T, Kitada C, Mori M, Onda H, Fujino M, "Identification of neuropeptide W as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptors GPR7 and GPR8", <i>J Biol Chem</i> , 277, 35826-35832, 2002
28	Kitamura Y, Tanaka H, Motoike T, Ishii M, Williams SC, Yanagisawa M, Sakurai T, "Distribution of neuropeptide W immunoreactivity and mRNA in adult rat brain", <i>Brain Res</i> , 1093, 123-134, 2006
29	Kelly MA, Beuckmann CT, Williams SC, Sinton CM, Motoike T, Richardson JA, Hammer RE, Garry MG, Yanagisawa M, "Neuropeptide B-deficient mice demonstrate hyperalgesia in response to inflammatory pain", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 102, 9942-9947, 2005
30	Xiong YM, Miyamoto N, Shibata K, Valasek MA, Motoike T, Kedzierski RM, Yanagisawa M, "Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 101, 1045-1050, 2004
31	Takayasu S, Sakurai T, Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC, Iguchi H, Kawasawa YI, Ikeda Y, Sakakibara L, Ohno K, Ioka RX, Murakami S, Dohmae N, Xie J, Suda T, Motoike T, Ohuchi T, Yanagisawa M, Sakai J, "A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 103, 7438-7443, 2006
32	Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y, Shintani Y, Hinuma S, Fujino M, "A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats", <i>J Biol Chem</i> , 278, 46387-46395, 2003
33	Irukayama-Tomobe Y, Tanaka H, Yokomizo T, Hashidate-Yoshida T, Yanagisawa M, Sakurai T, "Aromatic D-amino acids act as chemoattractant factors for human leukocytes through a G protein-coupled receptor, GPR109B", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 106, 3930-3934, 2009
34	Wise A, Foord SM, Fraser NJ, Barnes AA, Elshourbagy N, Eilert M, Ignar DM, Murdock PR, Steplewski K, Green A, Brown AJ, Dowell SJ, Szekeres PG, Hassall DG, Marshall FH, Wilson S, Pike NB, "Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid", <i>J Biol Chem</i> , 278, 9869-9874, 2003

35	Iguchi H, Ikeda Y, Okamura M, Tanaka T, Urashima Y, Ohguchi H, Takayasu S, Kojima N, Iwasaki S, Ohashi R, Jiang S, Hasegawa G, Ioka RX, Magoori K, Sumi K, Maejima T, Uchida A, Naito M, Osborne TF, Yanagisawa M, Yamamoto TT, Kodama T, Sakai J, "SOX6 attenuates glucose-stimulated insulin secretion by repressing PDX1 transcriptional activity and is down-regulated in hyperinsulinemic obese mice", <i>J Biol Chem</i> , 280, 37669-37680, 2005
36	Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J, "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 100, 15924-15929, 2003
37	Yamamoto J, Ikeda Y, Iguchi H, Fujino T, Tanaka T, Asaba H, Iwasaki S, Ioka RX, Kaneko IW, Magoori K, Takahashi S, Mori T, Sakaue H, Kodama T, Yanagisawa M, Yamamoto TT, Ito S, Sakai JA, "Kruppel-like factor KLF15 contributes fasting-induced transcriptional activation of mitochondrial acetyl-CoA synthetase gene <i>AceCS2</i> ", <i>J Biol Chem</i> , 279, 16954-16962, 2004
38	Fujino T, Asaba H, Kang MJ, Ikeda Y, Sone H, Takada S, Kim DH, Ioka RX, Ono M, Tomoyori H, Okubo M, Murase T, Kamataki A, Yamamoto J, Magoori K, Takahashi S, Miyamoto Y, Oishi H, Nose M, Okazaki M, Usui S, Imaizumi K, Yanagisawa M, Sakai J, Yamamoto TT, "Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion", <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> , 100, 229-34, 2003
39	Yanagita M, Okuda T, Endo S, Tanaka M, Takahashi K, Sugiyama F, Kunita S, Takahashi S, Fukatsu A, Yanagisawa M, Kita T, Sakurai T, "Uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1), a novel BMP antagonist expressed in the kidney, accelerates tubular injury", <i>J Clin Invest</i> , 116, 70-79, 2006
40	Iguchi H, Urashima Y, Inagaki Y, Ikeda Y, Okamura M, Tanaka T, Uchida A, Yamamoto TT, Kodama T, Sakai J, "SOX6 suppresses cyclin D1 promoter activity by interacting with beta-catenin and histone deacetylase 1, and its down-regulation induces pancreatic beta-cell proliferation", <i>J Biol Chem</i> , 282, 19052-19062, 2007
41	Sasaki K, Suzuki M, Mieda M, Tsujino N, Roth B, Sakurai T, "Pharmacogenetic Modulation of Orexin Neurons Alters Sleep/Wakefulness States in Mice", <i>PLoS ONE</i> , 6, e20360, 2011
42	Hondo M, Furutani N, Yamasaki M, Watanabe M, Sakurai T, "Orexin Neurons Receive Glycinergic Innervations", <i>PLoS ONE</i> , 6, e25076, 2011

43	Mieda M, Hasegawa E, Kisanuki YY, Sinton CM, Yanagisawa M, Sakurai T, "Differential Roles of Orexin Receptor-1 and-2 in the Regulation of Non-REM and REM Sleep", <i>J Neuroscience</i> , 31, 6518-6526, 2011
44	Matsuki T, Nomiyama M, Takahira H, Hirashima N, Kunita S, Takahashi S, Yagami K, Kilduff TS, Bettler B, Yanagisawa M, Sakurai T, "Selective loss of GABA(B) receptors in orexin-producing neurons results in disrupted sleep/wakefulness architecture", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 106, 4459-4464, 2009
45	Funato H, Tsai AL, Willie JT, Kisanuki Y, Williams SC, Sakurai T, Yanagisawa M., "Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity", <i>Cell Metab</i> , 9, 64-76, 2009.
46	Shiuchi T, Haque MS, Okamoto S, Inoue T, Kageyama H, Lee S, Toda C, Suzuki A, Bachman ES, Kim YB, Sakurai T, Yanagisawa M, Shioda S, Imoto K, Minokoshi Y., "Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system.", <i>Cell Metab</i> , 10, 466-80, 2009
47	Perello M, Sakata I, Birnbaum S, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Woloszyn J, Yanagisawa M, Lutter M, Zigman JM., "Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner", <i>Biol Psychiatry</i> , 67, 880-6,2010
48	Matsuo E, Mochizuki A, Nakayama K, Nakamura S, Yamamoto T, Shioda S, Sakurai T, Yanagisawa M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Inoue T, "Decreased intake of sucrose solutions in orexin knockout mice", <i>J Mol Neurosci</i> , 43, 217-224, 2011
49	桜井武, "オレキシンによる覚醒と睡眠の制御", 蛋白質・核酸・酵素, 52, 1840-1848, 2007
50	US 2010/0150840 A1 (Filed: Jun. 4, 2009)
51	Nagata-Kuroiwa R, Furutani N, Hara J, Hondo M, Ishii M, Abe T, Mieda M, Tsujino N, Motoike T, Yanagawa Y, Kuwaki T, Yamamoto M, Yanagisawa M, Sakurai T, "Critical Role of Neuropeptides B/W Receptor 1 Signaling in Social Behavior and Fear Memory", <i>PLoS One</i> , 6, e16972, 2011
52	科学研究費補助金研究成果報告書より引用 http://kaken.nii.ac.jp/pdf/2010/seika/mext/13301/20020010seika.pdf
53	Fitzgerald DA, Angstadt M, Jelsone LM, Nathan PJ, Phan KL, Beyond threat: amygdala reactivity across multiple expressions of facial affect, <i>Neuroimage</i> , 30, 1441-1448, 2006
54	Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, Hammer RE, Williams SC, Crowley J, Yanagisawa M, Gordon JI, "Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 105, 16767-16772, 2008
55	WO 2010/030997

56	Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Nishikawa NS, Tanaka T, Sakakibara I, Kitakami J, Ihara S, Hashimoto Y, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Sakai J, “The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop”, <i>Mol Cell Biol</i> , 29, 3544-3555, 2009
57	http://www8.cao.go.jp/cstp/sentan/jisedai_kettei.html
58	Voisin T, Firar AE, Avondo V, Laburthe M, “Orexin-induced apoptosis: the key role of the seven-transmembrane domain orexin type 2 receptor”, <i>Endocrinology</i> , 147, 4977-4984, 2006
59	Voisin T, El Firar A, Rouyer-Fessard C, Gratio V, Laburthe M, “A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism”, <i>FASEB J</i> , 22, 1993-2002, 2008
60	El Firar A, Voisin T, Rouyer-Fessard C, Ostuni MA, Couvineau A, Laburthe M, “Discovery of a functional immunoreceptor tyrosine-based switch motif in a 7-transmembrane-spanning receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven apoptosis”, <i>FASEB J</i> , 23, 4069-4080, 2009
61	Voisin T, El Firar A, Fasseu M, Rouyer-Fessard C, Descatoire V, Walker F, Paradis V, Bedossa P, Henin D, Lehy T, Laburthe M, “Aberrant expression of OX1 receptors for orexins in colon cancers and liver metastases: an openable gate to apoptosis”, <i>Cancer Res</i> , 71, 3341-3351, 2011
62	Zhou L, Sun WL, See RE, “Orexin Receptor Targets for Anti-Relapse Medication Development in Drug Addiction”, <i>Pharmaceuticals</i> , 4,804-821, 2011 (Review)
63	Boutrel B, de Lecea L, “Addiction and arousal: the hypocretin connection”, <i>Physiol Behav</i> , 93, 947-951, 2008
64	Shoblock JR, Welty N, Aluisio L, Fraser I, Motley ST, Morton K, Palmer J, Bonaventure P, Carruthers NI, Lovenberg TW, Boggs J, Galici R, “Selective blockade of the orexin-2 receptor attenuates ethanol self-administration, place preference, and reinstatement”, <i>Psychopharmacology</i> , 215, 191-203, 2011
65	Kang JE, Lim MM, Bateman RJ, Lee JJ, Smyth LP, Cirrito JR, Fujiki N, Nishino S, Holtzman DM, “myloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle”, <i>Science</i> , 326, 1005-1007, 2009
66	Mieda M, Williams SC, Richardson JA, Tanaka K, Yanagisawa M, “The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker”, <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> , 103, 12150-12155, 2006

67	Chung S, Funakoshi T, Civelli O, "Orphan GPCR research", <i>Br J Pharmacol</i> ,153, S339-S346, 2008
68	McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM, "RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor", <i>Nature</i> , 393, 333-339, 1998
69	Lappano R, Maggiolini M, "G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer", <i>Nat Rev Drug Discov</i> , 10, 47-60, 2011
70	Baranowska B, Wolińska-Witort E, Martyńska L, Chmielowska M, Baranowska-Bik A, "Plasma orexin A, orexin B, leptin, neuropeptide Y (NPY) and insulin in obese women", <i>Neuro Endocrinol Lett</i> , 26, 293-296, 2005
71	Ingold B, Simon E, Ungethüm U, Kuban RJ, Müller BM, Lupp A, Neumann U, Ebert MP, Denkert C, Weichert W, Schulz S, Röcken C, "Vascular CXCR4 expression - a novel antiangiogenic target in gastric cancer?", <i>PLoS ONE</i> , 5, e10087, 2010