

博士論文

新規統合失調症治療薬としての phosphodiesterase 10A (PDE10A) 阻害薬の薬理的解析

荒川 慶太

NOTICE:

This document contains the Accepted Manuscript version of published works that appeared in final form in *Pharmacology Research and Perspectives* and *Behavioural Brain Research* after peer review and technical editing by the publisher. To access the final edited and published work, see *Pharmacol Res Perspect.* (2016) 4(4): e00241, DOI: 10.1002/prp2.241 and *Behav Brain Res.* (2017) 317: 204–209, Doi: 10.1016/j.bbr.2016.09.043.

目次

略語.....	1
序論.....	3
第一章 新規 PDE10A 阻害薬、PDM-042 のプロファイリング.....	7
1-1 PDM-042 の in vitro および薬物動態学的プロファイル	7
1-2 ラット線条体膜画分中の PDE10A に対する [³ H]PDM-042 の結合試験.....	13
1-3 ラット線条体における PDM-042 の PDE10A 占有率	14
第二章 PDM-042 の抗精神病様作用および認知機能改善作用の評価	15
2-1 ラットの自発運動量に対する PDM-042 の作用.....	15
2-2 ラットの条件回避反応に対する PDM-042 の作用.....	16
2-3 ラットの認知機能に対する PDM-042 の作用.....	17
第三章 PDM-042 の認知機能改善作用および錐体外路症状におけるドパミン D ₁ 受容体シグナルの関与.....	19
3-1 PDM-042 の物体認識記憶の増加作用におけるドパミン D ₁ 受容体シグナルの関与 ...	19
3-2 ラットの錐体外路症状に対する PDM-042 の作用.....	20
3-3 PDM-042 の錐体外路症状におけるドパミン D ₁ 受容体シグナルの関与	21
第四章 PDM-042 の血中プロラクチン濃度および血糖値への影響	23
4-1 ラットの血中プロラクチン濃度に対する PDM-042 の作用.....	23
4-2 ラットの血糖値に対する PDM-042 の作用.....	23
考察.....	25

総括.....	32
謝辞.....	34
実験項.....	35
参考文献.....	44

略語

^3H	トリチウム
AUC	経時推移曲線下面積
B_{\max}	最大結合量
CaCl_2	塩化カルシウム
cAMP	環状アデノシンーリン酸
cGMP	環状グアノシンーリン酸
CS	条件刺激
DPM	壊変毎分
F	生体利用率
IC_{50}	50%阻害濃度
i.p.	腹腔内投与
i.v.	静脈内投与
K_d	解離定数
K_i	阻害定数
MATRICES	Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia
$\text{Mg}(\text{CHCOO})_2$	酢酸マグネシウム
MK-801	(5R,10S)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine
MP-10	2-[4-(1-methyl-4-pyridin-4-yl-1H-pyrazol-3-yl)-phenoxy]methyl-quinoline
MSN	中型有棘神経細胞
NMDA	N-methyl-D-aspartate
PDE	ホスホジエステラーゼ
PDM-042	(E)-4-(2-(2-(5,8-dimethyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrazin-2-yl)vinyl)-6-(pyrrolidin-1-yl)pyrimidin-4-yl)morpholine
PKA	プロテインキナーゼ A
p.o.	経口投与
s.c.	皮下投与

SCH23390	(R)-(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride
Tris-HCl	トリス塩酸緩衝液
UCS	非条件刺激

序論

統合失調症は思春期や青年期に発症する精神疾患であり、罹患率は総人口の約 1%と比較的高い。統合失調症の症状は多彩で一義的ではないものの、主症状として幻覚、妄想などの陽性症状、感情鈍磨、意欲減退などの陰性症状、注意力低下、実行機能障害などの認知機能障害を示す。特に、認知機能障害は言語、作業能力、対人関係等に多大な影響を与え、患者の社会復帰を遅らせる原因であることから、統合失調症の中核症状であると考えられている (1)。また、既存の統合失調症治療薬の認知機能障害に対する有効性が乏しいことから、非常にアンメットニーズが高い。現在使用されている統合失調症治療薬は chlorpromazine や haloperidol などの定型抗精神病薬、risperidone や clozapine、olanzapine などの非定型抗精神病薬に大別される。定型抗精神病薬は、その作用機序として主にドパミン D₂受容体の拮抗作用を有し、中脳辺縁系のドパミン D₂受容体を遮断することにより陽性症状には一定の治療効果を示すものの、陰性症状や認知機能障害に対する作用に乏しい (2, 3)。また、黒質線条体経路のドパミン D₂受容体も遮断するために、錐体外路症状と呼ばれる寡動や筋硬直などの運動性の副作用を発現することが問題となっている (4, 5)。これらの問題点を克服した次世代の抗精神病薬として複数の非定型抗精神病薬が開発されてきた。非定型抗精神病薬は、ドパミン D₂受容体の拮抗作用に加えてセロトニン 5-HT_{2A}などの複数の受容体に親和性を示すことが特徴であるが、錐体外路症状に加えて、血糖値増加、体重増加、血中プロラクチン濃度上昇などの新たな副作用を発現することが明らかになっている (5-7)。これらの副作用は糖尿病や心血管系の疾病リスクの増加、乳汁分泌や性機能不全などにつながることから、忍容性の低下から服薬中断に至る原因になっている。近年、ドパミンシステムスタビライザーと呼ばれるドパミン D₂受容体部分アゴニスト作用を有する aripiprazole が開発されたものの、糖尿病性アシドーシスや糖尿病性昏睡等の重大な副作用が報告され、その使用に対して警告がなされている。また、依然として陰性症状や認知機能障害に対する改善作用は限定的である。従って、陰性症状や認知機能障害にも有効性を示し、副作用が少ない新規メカニズムを有する統合失調症治療薬が切望されている。

ホスホジエステラーゼ (PDE)は環状ヌクレオチドである cAMP (環状アデノシンーリン酸)および cGMP (環状グアノシンーリン酸)を加水分解する酵素であり、PDE1 から 11 のアイソザイムで構成されている (8)。これらの中で、PDE10A は哺乳類の脳、特に線条体で最も強く発現し、

側坐核においても強い発現が認められる (9-13)。一方、わずかではあるが海馬、皮質、小脳顆粒細胞層にも発現しており、末梢組織における発現は限定的である (9, 12-15)。PDE10A は、線条体の中でも中型有棘神経細胞 (MSN)に多く発現し (10, 12, 13)、MSN にはドパミン D₂受容体を発現している間接路、ドパミン D₁受容体を発現している直接路が存在することが知られている (16, 17)。ドパミン D₂受容体は Gi タンパク質と共役しているため、ドパミン刺激により cAMP/プロテインキナーゼ A (PKA)シグナルを抑制し、その下流で淡蒼球内節および黒質網様部から視床への抑制性神経伝達を強化している。一方、ドパミン D₁受容体は Gs タンパク質と共役しているため、ドパミン刺激により cAMP/PKA シグナルを活性化し、淡蒼球内節および黒質網様部から視床への抑制性神経伝達の脱抑制作用を示す (18)。つまり、間接路と直接路は線条体の神経出力において相反する作用を発揮している。PDE10A は MSN の間接路、直接路の両方に発現しているため (18-20)、線条体の MSN における PDE10A を阻害することにより、間接路におけるドパミン D₂受容体および直接路におけるドパミン D₁受容体の下流において cAMP/PKA シグナルが活性化すると想定される。従って、線条体の MSN における PDE10A の阻害によりドパミン D₂受容体シグナルの抑制およびドパミン D₁受容体シグナルの活性化が引き起こされると考えられる。それ故、PDE10A 阻害薬はドパミン D₂受容体アンタゴニスト様作用に加えてドパミン D₁受容体アゴニスト様作用を併せ持つという既存の抗精神病薬とは異なるユニークな特徴を有すると想定されている。

PDE10A の発現部位や、ドパミン受容体の下流におけるシグナル伝達調節機能が明らかとなる一方で、PDE10A 遺伝子の欠損マウスや PDE10A 阻害薬を投与されたげっ歯類の行動薬理的な評価結果が報告されてきた。PDE10A 遺伝子の欠損マウスの表現型解析において、PDE10A 遺伝子の欠損マウスは野生型のマウスと比較して条件回避反応の学習遅延を示し、N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体拮抗薬に対する反応性が減弱し、用量依存的な自発運動量の増加を示さなかった (21, 22)。これらの表現型はげっ歯類におけるドパミン D₂受容体拮抗薬による抗精神病様作用と類似していることから、PDE10A 阻害薬が新規統合失調症治療薬になりうる可能性が強く示唆された (21, 22)。また、構造の異なる複数の PDE10A 阻害薬がげっ歯類において既存の統合失調症治療薬と同様に抗精神病様作用を示すことが報告され (23-26)、薬理的な PDE10A の阻害により抗精神病様作用が発現することが示された。最近では TAK-063、THPP-1、SEP-39 等の構造の異なる複数の PDE10A 阻害薬がげっ歯類において抗精神病様作用だけでなく、

認知機能改善作用を併せ持つことが報告されており (25, 27, 28)、PDE10A 阻害薬が抗精神病様作用に加えて既存の統合失調症治療薬では治療効果が不十分である認知機能障害に対しても改善作用を有する可能性が示唆されている。

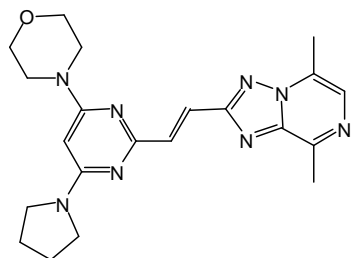
このように構造の異なる複数の PDE10A 阻害薬の非臨床評価結果が報告される一方、私は PDE10A 阻害薬の探索研究を通じて、リード化合物からの誘導合成により、トリアゾロピラジン骨格を有する新規 PDE10A 阻害薬である PDM-042 ((*E*)-4-(2-(2-(5,8-dimethyl-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrazin-2-yl)vinyl)-6-(pyrrolidin-1-yl)pyrimidin-4-yl)morpholine) (図 1 A)を見出した。従って、本研究では PDM-042 の統合失調症治療薬としての可能性について評価することを目的とした。まず、PDM-042 の *in vitro* および薬物動態学的プロファイル等の PDM-042 の基本的な薬物プロファイルについて明らかにした。また、PDM-042 のトリチウム標識体である [³H]PDM-042 (図 1 B)を用いて、PDM-042 の線条体における PDE10A 占有率を評価した。次に、複数のラットモデルを用いて PDM-042 の抗精神病様作用について評価し、新奇物体認識試験を用いて PDM-042 の認知機能に対する作用について評価した。さらに、抗精神病様作用と認知機能改善作用に加えて、副作用プロファイルとして錐体外路症状、血中プロラクチン濃度および血糖値についてラットを用いて評価し、代表的な非定型抗精神病薬である olanzapine や risperidone と比較した。

これまでに構造の異なる複数の PDE10A 阻害薬がげっ歯類において抗精神病様作用を示すことが報告されており、この薬理作用には既存の抗精神病薬と同様にドパミン D₂ 受容体アンタゴニスト様作用が関与していると想定される。一方、PDE10A 阻害薬は既存の抗精神病薬とは異なり、錐体外路症状の発現が軽微であることも報告され (24, 26)、*in vivo* における PDE10A 阻害薬の薬理作用にドパミン D₂ 受容体アンタゴニスト様作用だけでなく、ドパミン D₁ 受容体アゴニスト様作用も寄与している可能性が示唆された。実際にドパミン D₁ 受容体アンタゴニストである SCH23390 を用いた検討により、PDE10A 阻害薬である TP-10 は単独では apomorphine 誘発のブレパルスインヒビション障害を改善しないが、SCH23390 を併用することにより改善作用が認められるようになること (29)や MP-10 による錐体外路症状が SCH23390 により亢進することが報告された (30)。これらの結果より、PDE10A 阻害薬の感覚運動ゲーティング機能や錐体外路症状に対する作用にドパミン D₁ 受容体シグナルの活性化が関与していることが示唆される。しかしながら、PDE10A 阻害薬の認知機能改善作用に対するドパミン D₁ 受容体シグナルの関与につ

いて実験的に検証された報告はほとんど無く、不明な点が多い。古くからドパミン D₁ 受容体シグナルと認知機能との関連性は多数報告されており、最近ではドパミン D₁ 受容体アゴニストである SKF38393 がラットにおいて物体認識記憶を増加させる (31, 32) ことに加え、ドパミン D₁ 受容体アゴニストである DAR-0100A が少数例ではあるものの、統合失調症患者における作業記憶障害を改善したことが報告されており (33)、ドパミン D₁ 受容体シグナルの活性化が統合失調症における認知機能改善作用に寄与する可能性が示唆されている。そこで、私は PDE10A 阻害薬の認知機能改善作用にドパミン D₁ 受容体シグナルの活性化が関与している可能性に注目し、PDM-042 の認知機能改善作用に対するドパミン D₁ 受容体シグナルの関与についてドパミン D₁ 受容体アンタゴニストである SCH23390 を用いて評価した。さらに、錐体外路症状におけるドパミン D₁ 受容体シグナルの関与についても SCH23390 を用いて評価した。

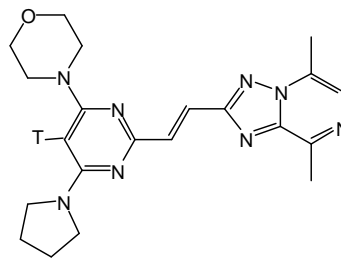
図 1. PDM-042 (A) および [³H]PDM-042 (B) の化学構造

A



PDM-042

B



[³H]PDM-042

T は ³H を示す。

第一章 新規 PDE10A 阻害薬、PDM-042 のプロファイリング

1-1 PDM-042 の in vitro および薬物動態学的プロファイル

PDM-042 の PDE10A に対する in vitro 活性を評価するために、酵素アッセイを用いてヒト組換え PDE10A およびラット組換え PDE10A に対する阻害活性を IC_{50} および K_i で算出した。PDM-042 のヒトおよびラット PDE10A に対する IC_{50} はそれぞれ 0.83、0.82 nM であり、 K_i はそれぞれ 0.36、0.59 nM であった。また、PDM-042 の 1 μ M における他の PDE アイソザイムに対する阻害率は 50%未満であった (表 1)。従って、PDM-042 は他の PDE アイソザイムに対して 1000 倍以上の選択性を有することが示された。さらに、PDM-042 (10 μ M) に対する神経伝達物質受容体、酵素、イオンチャネル、各種トランスポーターなどの 137 種類の標的分子に対する親和性を評価した結果、結合アッセイにより 50%以上の阻害活性を示したのはムスカリン M_2 受容体およびニューロキニン 1 受容体の 2 つのみであり (表 2)、酵素アッセイにより 50%以上の阻害活性を示したのは PDE6 のみであった (表 3)。結合アッセイで 50%以上の親和性を示したムスカリン M_2 受容体およびニューロキニン 1 受容体に対してフォローアップとして機能アッセイを実施した結果、PDM-042 は 10 μ M までムスカリン M_2 受容体およびニューロキニン 1 受容体に対してアゴニスト、アンタゴニスト活性のいずれも示さなかった。

PDM-042 の薬物動態学的評価の結果を表 4 に示した。ラットおよびイヌに PDM-042 を 0.3 mg/kg の用量で経口投与した際の生体利用率はそれぞれ 33%、42%であった。また、ラットに PDM-042 を 0.3 mg/kg の用量で経口投与した 60 分後の線条体中濃度の血漿中濃度に対する比は 6.3 であり、非常に良好な脳内移行性を示した (表 5)。これらの結果から、PDM-042 は種差無く PDE10A に対する優れた阻害活性を有し、オフターゲット活性を示さない高い選択性、経口活性および良好な脳内移行性を有する PDE10A 阻害薬であることが示された。

表 1. PDM-042 (1 μ M)の他 PDE アイソザイムに対する阻害率

PDE	動物種	阻害率 (%)
1A	ヒト	12
2A	ヒト	23
3A	ヒト	-4
4A1A	ヒト	12
4B1	ヒト	9
5A	ヒト	13
6	ウシ	28
7A	ヒト	38
7B	ヒト	10
8A1	ヒト	0
9A2	ヒト	-1
10A2	ヒト	101
11A4	ヒト	-4

表 2. PDM-042 (10 μ M)のオフターゲット活性 (結合アッセイ)

標的分子	阻害率 (%)	標的分子	阻害率 (%)
A ₁ (h)	5	β_1 (h)	-3
A _{2A} (h)	22	β_2 (h)	2
A _{2B} (h)	11	β_3 (h)	-19
A ₃ (h)	-26	AT ₁ (h)	10
α_{1A} (h)	3	AT ₂ (h)	-1
α_{1B} (h)	-1	APJ (apelin) (h)	-10
α_{2A} (h)	-4	BZD (central)	-3
α_{2B} (h)	-3	BB ₃ (h)	-24
α_{2C} (h)	-6	B ₂ (h)	5

次頁へ続く

標の分子	阻害率 (%)	標の分子	阻害率 (%)
CB ₁ (h)	7	I ₁	-35
CB ₂ (h)	34	BLT ₁ (LTB ₄) (h)	0
CCK ₁ (CCK _A) (h)	-33	CysLT ₁ (LTD ₄) (h)	-10
CCK ₂ (CCK _B) (h)	-16	MCH ₁ (h)	-7
CRF ₁ (h)	13	MC ₁	-3
D ₁ (h)	5	MC ₃ (h)	-14
D _{2S} (h)	-2	MC ₄ (h)	3
D ₃ (h)	10	MT ₁ (ML _{1A}) (h)	15
ET _A (h)	-6	MT ₃ (ML ₂)	34
ET _B (h)	-4	MAO-A	2
GABA _{A1}	-9	motilin (h)	6
(α 1, β 2, γ 2) (h)		M ₁ (h)	26
GABA _{B(1b)} (h)	-1	M ₂ (h)	90
glucagon (h)	-17	M ₃ (h)	3
AMPA	-8	M ₄ (h)	47
kainate	1	NK ₁ (h)	82
NMDA	-3	NK ₂ (h)	16
Glycine	-11	Y ₁ (h)	2
(strychnine-insensitive)		N neuronal α 4 β 2 (h)	-13
CXCR4 (h)	-8	N muscle-type (h)	25
TNF- α (h)	-4	δ ₂ (DOP) (h)	27
CCR2 (h)	10	κ (KOP)	4
H ₁ (h)	8	μ (MOP) (h)	17
H ₂ (h)	-18	NOP (ORL1) (h)	6
H ₃ (h)	4	PPAR γ (h)	3
H ₄ (h)	-2	PAF (h)	13

次頁に続く

標的分子	阻害率 (%)	標的分子	阻害率 (%)
PCP	4	UT (h)	6
EP ₂ (h)	14	VPAC ₁ (VIP ₁)	1
FP (h)	-9	V _{1a} (h)	7
IP (PGI ₂) (h)	22	V ₂ (h)	11
LXRβ (h)	-19	Ca ²⁺ channel	19
5-HT _{1A} (h)	-1	(L, dihydropyridine site)	
5-HT _{1B}	-14	Ca ²⁺ channel (L, diltiazem site)	-56
5-HT _{1D}	-1	(benzothiazepines)	
5-HT _{2A} (h)	-1	Ca ²⁺ channel (L, verapamil site)	10
5-HT _{2B} (h)	-2	(phenylalkylamine)	
5-HT _{2C} (h)	0	Ca ²⁺ channel (N)	-22
5-HT ₃ (h)	-1	SK _{Ca} channel	4
5-HT ₆ (h)	-3	Na ⁺ channel (site2)	4
5-HT ₇ (h)	-13	Cl ⁻ channel	20
σ (non-selective)	-33	(GABA-gated)	
sst ₁ (h)	-1	Norepinephrine	4
sst ₄ (h)	-32	transporter (h)	
GR (h)	-10	dopamine transporter (h)	3
ERα (h)	-9	GABA transporter	-3
AR (h)	5	choline transporter (CHT1) (h)	14
TR (TH)	-10	5-HT transporter (h)	-2

(h)はヒトの標的を表す。

表 3. PDM-042 (10 μ M)のオフターゲット活性 (酵素アッセイ)

標的分子	阻害率 (%)	標的分子	阻害率 (%)
COX ₁ (h)	10	Ab1 kinase (h)	14
COX ₂ (h)	0	CamK2 α (h)	6
inducible NOS	10	CDK2 (h) (cycA)	-3
PDE2A ₁ (h)	38	ERK ₂ (h) (P42 ^{mapk})	7
PDE3B (h)	15	FLT-1 kinase (h)	-6
PDE4D ₂ (h)	18	(VEGFR1)	
PDE5 (h) (non-selective)	38	Fyn kinase (h)	9
PDE6 (non-selective)	57	IRK (h) (InsR)	37
ACE (h)	-13	Lyn A kinase (h)	-13
ACE-2 (h)	11	p38 α kinase (h)	0
BACE-1 (h) (β -secretase)	4	ZAP70 kinase (h)	-6
caspase-3 (h)	0	acetylcholinesterase (h)	4
caspase-9 (h)	11	COMT	-11
neutral endopeptidase (h)	-13	(catechol-O-methyl transferase)	
MMP-1 (h)	7	xanthine oxidase / superoxide	5
MMP-2 (h)	3	O ₂ ⁻ scavenging ATPase (Na ⁺ /K ⁺)	6
MMP-9 (h)	12	guanylyl cyclase (h)	1

(h)はヒトの標的を表す。

表 4. ラットおよびイヌにおける PDM-042 の薬物動態学的プロファイル

動物種	投与経路	用量 (mg/kg)	$T_{1/2}$ (h)	T_{max} (h)	C_{max} (nM)	F (%)
ラット	i.v.	0.1	4.6 ± 1.6			
	p.o.	0.3	6.0 ± 0.3	2.7 ± 1.2	36 ± 5	33
イヌ	i.v.	0.1	4.2 ± 0.5			
	p.o.	0.3	3.7 ± 1.5	1.2 ± 0.8	78 ± 4	42

各値は平均値 ± 標準偏差 (N = 3)を示す。

表 5. ラットにおける PDM-042 の脳内移行性

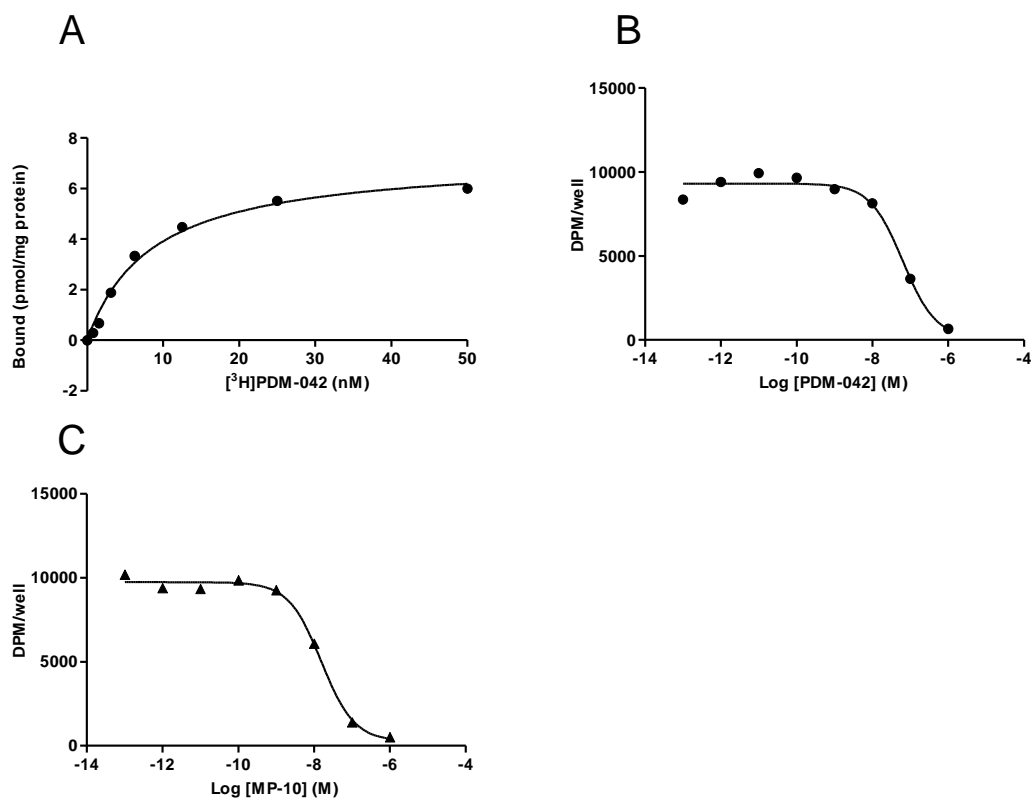
動物種	投与経路	用量 (mg/kg)	時間 (分)	血漿中濃度 (ng/mL)	線条体中濃度 (ng/g tissue)
ラット	p.o.	0.3	60	50 ± 10	317 ± 51

各値は平均値 ± 標準偏差 (N = 3)を示す。

1-2 ラット線条体膜画分中の PDE10A に対する ^3H]PDM-042 の結合試験

^3H]PDM-042 を用いて、ラット線条体膜画分中の PDE10A に対する結合試験を実施した。 ^3H]PDM-042 のラット線条体膜画分に対する特異的結合は濃度依存的な飽和曲線を示し (図 2A)、 K_d および B_{max} はそれぞれ 8.5 nM および 7.2 pmol/mg protein であった。また、結合阻害試験において、PDM-042 および構造の異なる PDE10A 阻害薬である MP-10 は濃度依存的に ^3H]PDM-042 の PDE10A への結合を阻害した (図 2B、2C)。

図 2. ラット線条体膜画分中の PDE10A に対する ^3H]PDM-042 の結合評価



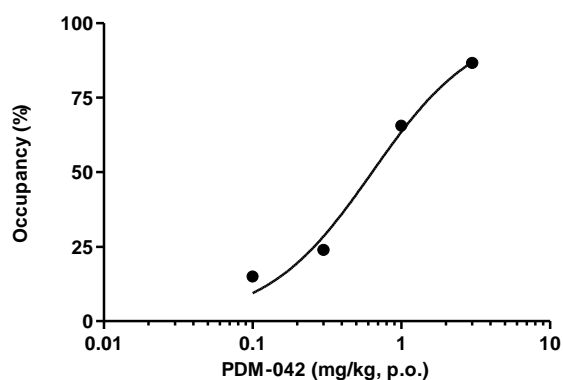
ラット線条体膜画分中の PDE10A に対する ^3H]PDM-042 の特異的結合 (A)および ^3H]PDM-042 の特異的結合に対する PDM-042 (B)または MP-10 (C)の濃度依存的な結合阻害について評価した。 ^3H]PDM-042 の濃度依存的な特異的結合の確認試験の際は ^3H]PDM-042 (0.78–50 nM)を膜画分 (50 μg)と共に 60 分間インキュベーションし、 ^3H]PDM-042 の各濃度における特異的結合を測定した。 ^3H]PDM-042 に対する PDM-042 および MP-10 の結合阻害試験の際は、 ^3H]PDM-042 (15 nM) と PDM-042 (0.1 pM–1 μM)または MP-10 (0.1 pM–1 μM)を膜画分 (50 μg)と共に 60 分間インキュ

バージョンし、各濃度における特異的結合を測定した。各値は duplicate で測定した平均値を示す。

1-3 ラット線条体における PDM-042 の PDE10A 占有率

1-2 の結果より、ラット線条体膜面分において $[^3\text{H}]\text{PDM-042}$ が PDE10A に特異的に結合し、その特異的結合に対して構造の異なる 2 つの PDE10A 阻害薬である PDM-042 および MP-10 が濃度依存的に阻害することが明らかとなった。従って、 $[^3\text{H}]\text{PDM-042}$ を用いて *in vivo* における PDM-042 の PDE10A 占有率を評価することが可能であると考えられた。そこで、ラットに PDM-042 を経口投与した際の線条体中 PDE10A に対する占有率を評価した。PDM-042 は用量依存的に線条体中 PDE10A の占有率を増加させ、3 mg/kg において 86.6% の占有率を示した (図 3)。

図 3. ラット線条体における PDM-042 の PDE10A 占有率の評価



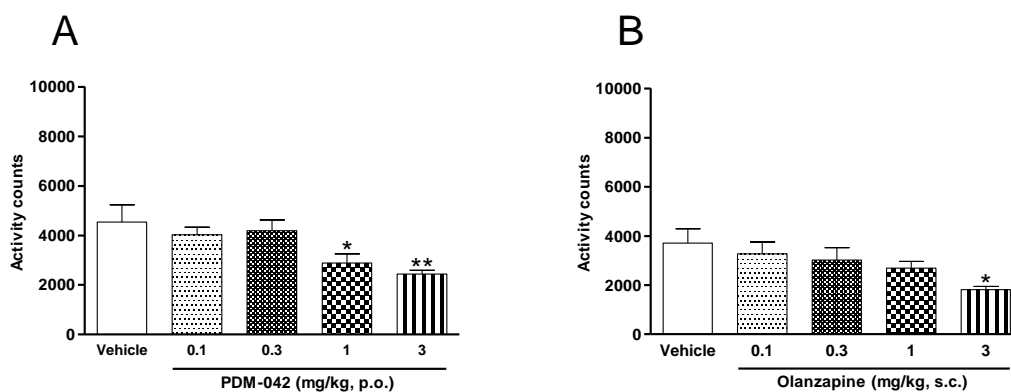
ラット線条体における PDM-042 の PDE10A 占有率について評価した。PDM-042 (0.1–3 mg/kg, p.o.) 投与後 50 分の時点で $[^3\text{H}]\text{PDM-042}$ (3 $\mu\text{Ci}/0.2$ mL, i.v.) を投与し、その 10 分後、両側の線条体を採取した。線条体ホモジネート中の放射活性を測定し、PDM-042 の各用量における PDE10A 占有率を算出した。各値は平均値 (N = 3) を示す。

第二章 PDM-042の抗精神病様作用および認知機能改善作用の評価

2-1 ラットの自発運動量に対する PDM-042 の作用

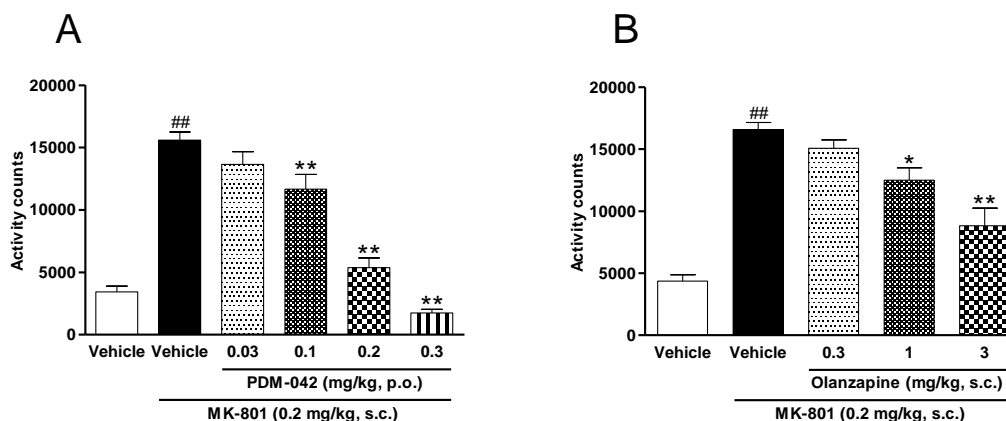
既存の統合失調症治療薬は MK-801 による自発運動量亢進を抑制することが知られており、ラットにおける抗精神病様作用の評価に汎用されている。そこで、ラットにおける PDM-042 単独の自発運動量の抑制作用を評価し、次に、MK-801 による自発運動量亢進作用に対する PDM-042 の抑制作用について評価した。PDM-042 は単独で自発運動量の抑制作用を示し、その作用は 1、3 mg/kg で有意であった (図 4A)。また、PDM-042 は MK-801 による自発運動量亢進に対して用量依存的な抑制作用を示し、その作用は 0.1–0.3mg/kg において有意であった (図 5A)。従って、PDM-042 は MK-801 による自発運動量亢進に対して有意な抑制作用を示す用量範囲では単独の自発運動量に対して影響を示さなかった。一方、olanzapine は MK-801 による自発運動量亢進に対して 1、3mg/kg において有意な抑制作用を示した (図 5B)ものの、3 mg/kg において単独で自発運動量を有意に減少させた (図 4B)。

図 4. ラットの自発運動量に対する PDM-042 および olanzapine の単独作用の評価



ラットの自発運動量に対する PDM-042 (A)および olanzapine (B)の単独作用について評価した。PDM-042 (0.1–3 mg/kg, p.o.)または olanzapine (0.1–3 mg/kg, s.c.)投与後 60 分間の自発運動量を持続的に測定した。各値は平均値 ± 標準誤差 (N = 6)を示す。*および**は、vehicle 投与群に対する統計学的有意性 ($P < 0.05$ および $P < 0.01$, Dunnett's test)を表す。

図 5. ラットの MK-801 による自発運動量亢進作用に対する PDM-042 および olanzapine の抑制作用

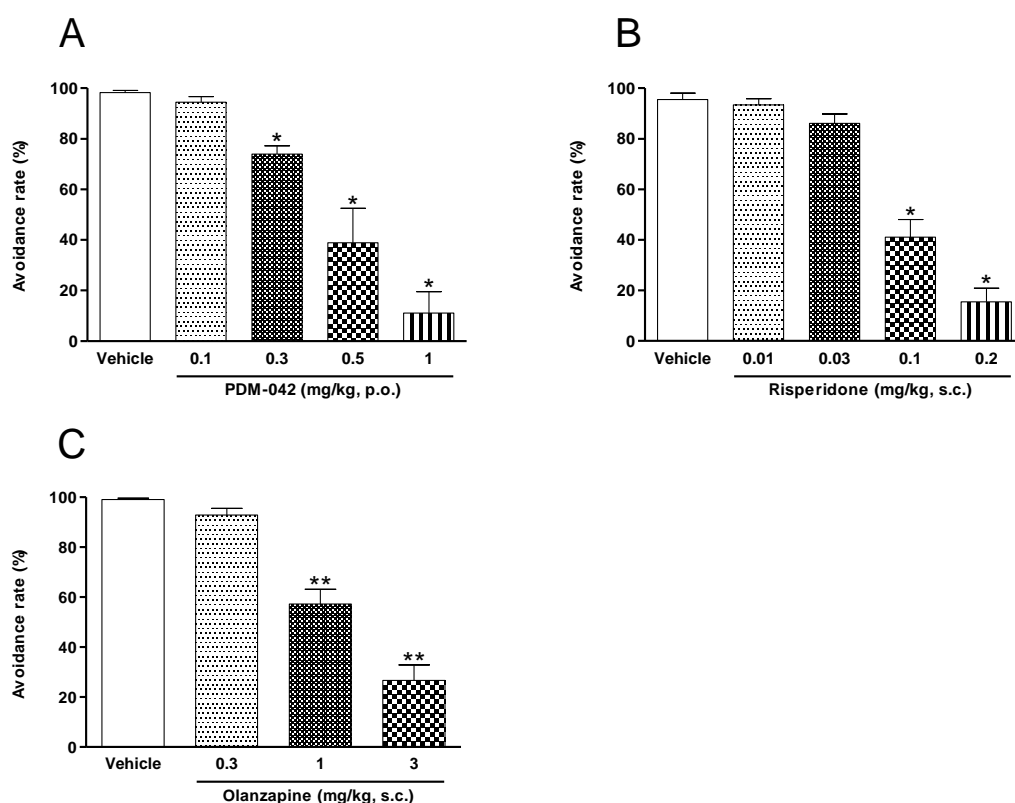


ラットの MK-801 による自発運動量亢進に対する PDM-042 (A) および olanzapine (B) の抑制作用について評価した。PDM-042 (0.03–0.3 mg/kg, p.o.) または olanzapine (0.3–3 mg/kg, s.c.) 投与後 60 分の時点で MK-801 (0.2 mg/kg, s.c.) を投与し、その直後から 60 分間の自発運動量を持続的に測定した。各値は平均値 ± 標準誤差 (N = 6–10) を示す。## は vehicle 投与群に対する統計学的有意性 ($P < 0.01$, *t*-test) を表し、* および ** は、MK-801 投与群に対する統計学的有意性 ($P < 0.05$ および $P < 0.01$, Dunnett's test) を表す。

2-2 ラットの条件回避反応に対する PDM-042 の作用

次に、ラットにおける抗精神病様作用の評価に汎用されている条件回避反応試験を用いて PDM-042、risperidone および olanzapine を評価した。PDM-042 は用量依存的な条件回避反応の抑制作用を示し、その作用は 0.3–1 mg/kg において有意であった (図 6A)。また、risperidone や olanzapine も用量依存的に条件回避反応を抑制し、risperidone は 0.1、0.2 mg/kg、olanzapine は 1、3 mg/kg において有意であった (図 6 B、C)。また、各薬物の全ての試験用量で escape failure の有意な増加は認められなかった。

図 6. ラットの条件回避反応に対する PDM-042、risperidone および olanzapine の抑制作用の評価

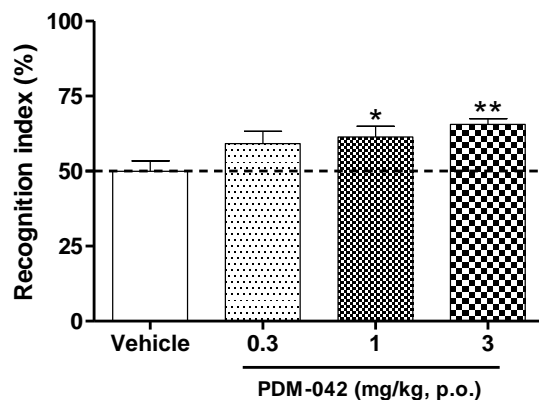


ラットの条件回避反応に対する PDM-042 (A)、risperidone (B) および olanzapine (C) の抑制作用について評価した。PDM-042 (0.1–1 mg/kg, p.o.) は投与後 60 分、risperidone (0.01–0.2 mg/kg, s.c.) または olanzapine (0.3–3 mg/kg, s.c.) は投与後 30 分の時点でトライアルを開始した。各値は平均値 ± 標準誤差 (N = 5–7) を示す。* および ** は、vehicle 投与群に対する統計学的有意性 ($P < 0.05$ および $P < 0.01$, Steel's test) を表す。

2-3 ラットの認知機能に対する PDM-042 の作用

新奇物体認識試験を用いて PDM-042 の認知機能改善作用を評価した。獲得試行から 48 時間後のテスト試行において、vehicle 投与群のラットにおける recognition index は約 50% であり、テスト試行において獲得試行で提示された物体を忘却していると考えられた。従って、この条件下で PDM-042 が物体認識記憶の増加作用を示すか否かを評価した。PDM-042 は用量依存的にラットの物体認識記憶を増加させ、その作用は 1, 3 mg/kg において有意であった (図 7)。また、PDM-042 は獲得試行およびテスト試行において、物体に対する総探索時間に影響を与えなかった (表 6)。

図 7. ラットの物体認識記憶に対する PDM-042 の作用の評価



ラットの物体認識記憶に対する PDM-042 の作用を評価した。PDM-042 (0.3–3 mg/kg, p.o.) を獲得試行直後に投与し、獲得試行から 48 時間後にテスト試行を実施した。各値は平均値 ± 標準誤差 (N = 12–16) を示す。*および**は、vehicle 投与群に対する統計学的有意性 ($P < 0.05$ および $P < 0.01$, Dunnett's test) を表す。

表 6. ラットの新奇物体認識試験 (PDM-042 の単独作用) における物体への総探索時間

投与群	用量 (mg/kg)	獲得試行 (秒)	テスト試行 (秒)	例数
Vehicle		20 ± 1	16 ± 1	16
PDM-042	0.3	20 ± 2	17 ± 2	12
PDM-042	1	17 ± 2	17 ± 1	13
PDM-042	3	22 ± 2	19 ± 2	15

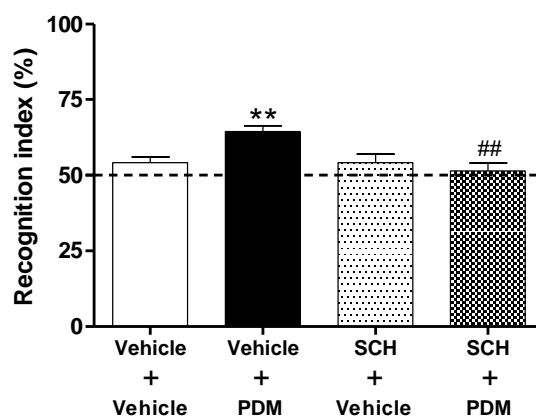
各値は平均値 ± 標準誤差を示す。

第三章 PDM-042 の認知機能改善作用および錐体外路症状におけるドパミン D₁ 受容体シグナルの関与

3-1 PDM-042 の物体認識記憶の増加作用におけるドパミン D₁ 受容体シグナルの関与

PDM-042 の物体認識記憶の増加作用におけるドパミン D₁ 受容体シグナルの関与についてドパミン D₁ 受容体アンタゴニストである SCH23390 を用いて評価した。2-3 の結果と同様に PDM-042 は 3 mg/kg においてラットの物体認識記憶を有意に増加させた。この物体認識記憶の増加作用に対して、SCH23390 は 0.1 mg/kg において有意な拮抗作用を示した (図 8)。一方、SCH23390 は 0.1 mg/kg において単独で物体認識記憶に影響を与えなかった (図 8)。また、PDM-042 および SCH23390 は獲得試行およびテスト試行において、物体に対する総探索時間に影響を与えなかった (表 7)。さらに、PDM-042 および SCH23390 の血漿中および脳内濃度は単独投与群と併用投与群で違いが認められなかった (表 8)。

図 8. PDM-042 の物体認識記憶の増加作用に対する SCH23390 の拮抗作用の評価



PDM-042 の物体認識記憶の増加作用に対する SCH23390 の拮抗作用について評価した。PDM-042 (3 mg/kg, p.o.) および SCH23390 (0.1 mg/kg, s.c.) は獲得試行直後に投与し、獲得試行から 48 時間後にテスト試行を実施した。各値は平均値 ± 標準誤差 (N = 10-13) を示す。PDM は PDM-042 を、SCH は SCH23390 を表す。**は、vehicle + vehicle 投与群に対する統計学的有意性 ($P < 0.01$, Bonferroni's test) を表し、## は、vehicle + PDM-042 投与群に対する統計学的有意性 ($P < 0.01$, Bonferroni's test) を表す。

表 7. ラットの新奇物体認識試験 (SCH23390 による拮抗作用)における物体への総探索時間

投与群	獲得試行 (秒)	テスト試行 (秒)	例数
Vehicle + Vehicle	16 ± 1	16 ± 2	10
Vehicle + PDM-042 (3 mg/kg)	19 ± 2	17 ± 2	10
SCH23390 (0.1 mg/kg) + Vehicle	17 ± 1	13 ± 1	10
SCH23390 (0.1 mg/kg) + PDM-042 (3 mg/kg)	19 ± 1	18 ± 2	13

各値は平均値 ± 標準誤差を示す。

表 8. ラットの新奇物体認識試験 (SCH23390 による拮抗作用)における PDM-042 および SCH23390 の血漿中および脳内濃度

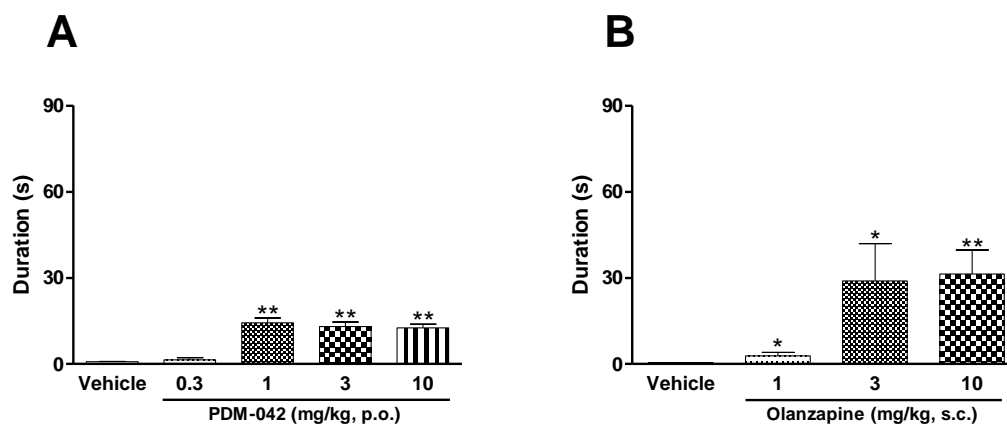
薬物	投与群	血漿中濃度 (ng/mL)	脳内濃度 (ng/g)
PDM-042	Vehicle + PDM-042	177 ± 101	335 ± 187
	SCH23390 + PDM-042	179 ± 31	403 ± 104
SCH23390	SCH23390 + Vehicle	7.3 ± 1.1	39 ± 4
	SCH23390 + PDM-042	8.1 ± 2.0	39 ± 8

PDM-042 (3 mg/kg, p.o.)および SCH23390 (0.1 mg/kg, s.c.)投与後 30 分の時点で血液および脳を採取し、血漿および脳内薬物濃度を測定した。各値は平均値 ± 標準偏差 (N = 4)を示す。

3-2 ラットの錐体外路症状に対する PDM-042 の作用

既存の抗精神病薬の錐体外路症状を反映する動物モデルとして汎用されているカタレプシー試験を用いてラットにおける PDM-042 および olanzapine のカタレプシー持続時間を評価した。PDM-042 は 1-10 mg/kg において有意なカタレプシー持続時間の増加を示したものの、その増加作用は 1 mg/kg で最大であり、10 mg/kg まで用量依存性は認められなかった (図 9A)。一方、olanzapine は 1-10 mg/kg において有意なカタレプシー持続時間の増加を示した (図 9B)。

図 9. ラットのカタレプシー試験に対する PDM-042 および olanzapine の作用の評価

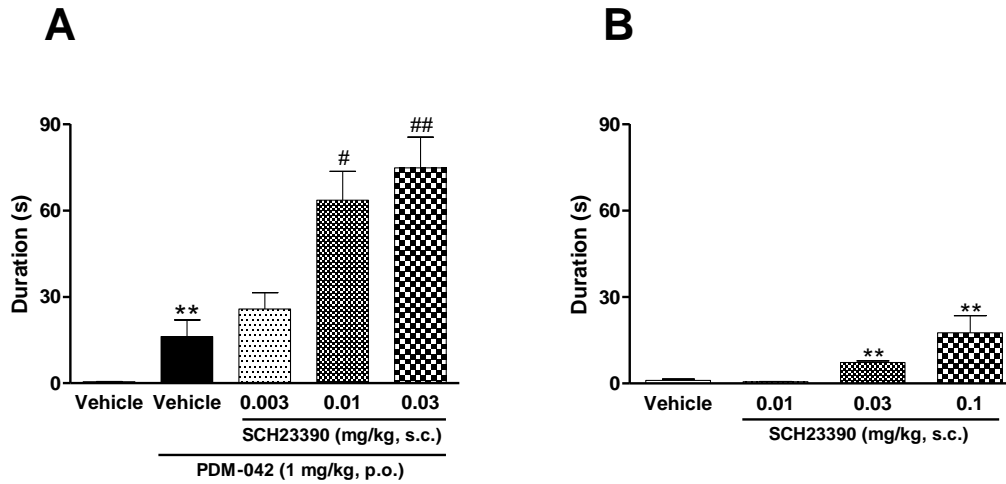


ラットのカタレプシー持続時間に対する PDM-042 (A)および olanzapine (B)の作用について評価した。PDM-042 (0.3–10 mg/kg, p.o.)はカタレプシー持続時間測定の前60分前、olanzapine (1–10 mg/kg, s.c.)は30分前に投与した。各値は平均値 ± 標準誤差 (N = 7)を示す。*および**は、vehicle 投与群に対する統計学的有意性 ($P < 0.05$ および $P < 0.01$, Steel's test)を表す。

3-3 PDM-042 の錐体外路症状におけるドパミン D₁ 受容体シグナルの関与

PDM-042 の限定的なカタレプシー増加作用に対するドパミン D₁ 受容体シグナルの関与について SCH23390 を用いて評価した。PDM-042 は 1 mg/kg において、3-2 の結果と同様に、軽微であるが、有意なカタレプシー持続時間の増加を示した。この PDM-042 によるカタレプシー増加作用を SCH23390 は用量依存的に亢進し、その作用は 0.01、0.03 mg/kg で有意であった (図 10A)。一方、SCH23390 は単独で用量依存的にカタレプシー持続時間を増加させ、その作用は 0.03、0.1 mg/kg で有意であった (図 10B)。

図 10. PDM-042 のカタレプシー増加作用に対する SCH23390 の作用の評価



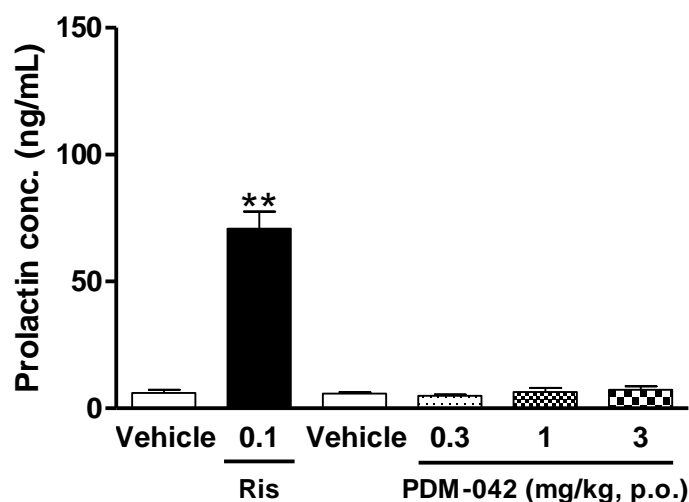
PDM-042 のカタレプシー増加作用に対する SCH23390 の亢進作用 (A)および SCH23390 単独のカタレプシー持続時間 (B)について評価した。PDM-042 (1 mg/kg, p.o.)はカタレプシー持続時間測定の前、SCH23390 (0.003–0.03 mg/kg, s.c.または 0.01–0.1 mg/kg, s.c.)は 30 分前に投与した。各値は平均値 ± 標準誤差 (N = 7)を示す。**は、vehicle 投与群に対する統計学的有意性 ($P < 0.01$, Wilcoxon's test (A)または Steel's test (B))を表す。#および##は vehicle + PDM-042 投与群に対する統計学的有意性 ($P < 0.05$ および $P < 0.01$, Steel's test)を表す。

第四章 PDM-042 の血中プロラクチン濃度および血糖値への影響

4-1 ラットの血中プロラクチン濃度に対する PDM-042 の作用

臨床において、risperidone は高プロラクチン血症を引き起こすことが知られているため、ラットにおける PDM-042 および risperidone の血中プロラクチン濃度への影響を評価した。PDM-042 は 3 mg/kg まで血中プロラクチン濃度に影響を与えなかったが、risperidone は 0.1 mg/kg において有意に血中プロラクチン濃度を増加させた (図 11)。

図 11. ラットの血中プロラクチン濃度に対する PDM-042 の作用の評価

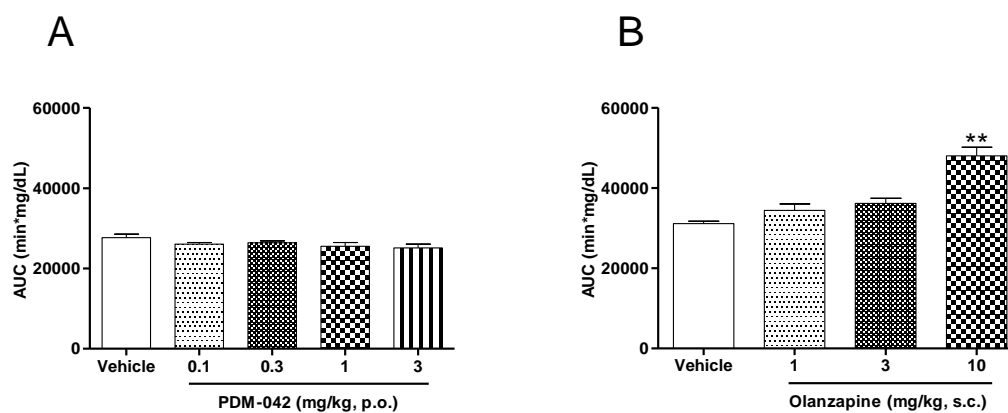


ラットの血中プロラクチン濃度に対する PDM-042 の作用について評価した。PDM-042 (0.3–3 mg/kg, p.o.)は採血の 60 分前、risperidone (0.1 mg/kg, s.c.)は 30 分前に投与した。各値は平均値 ± 標準誤差 (N = 6)を示す。Ris は risperidone を表す。**は、vehicle 投与群に対する統計学的有意性 ($P < 0.01$, *t*-test)を表す。

4-2 ラットの血糖値に対する PDM-042 の作用

臨床において、olanzapine は血糖値増加を引き起こすことが知られているため、ラットにおける PDM-042 および olanzapine の血糖値への影響を評価した。PDM-042 は 3 mg/kg まで血糖値に影響を与えなかった (図 12A)。一方、olanzapine は用量依存的に血糖値を増加させ、その作用は 10 mg/kg において有意であった (図 12B)。

図 12. ラットの血糖値に対する PDM-042 の作用の評価



ラットの血糖値に対する PDM-042 の作用について評価した。PDM-042 (0.1–3 mg/kg, p.o.)または olanzapine (1–10 mg/kg, s.c.)の投与 60 分後にグルコース (2g/kg, i.p.)を投与した。グルコースの投与 5 分前、15、30、60、120 分後に血液を採取し、それぞれの時点での血漿中グルコース濃度を測定した。各薬物投与群の血漿中グルコース濃度の経時推移曲線下面積 (AUC)を台形法で算出した。各値は平均値 ± 標準誤差 (N = 7–8)を示す。**は、vehicle 投与群に対する統計学的有意性 ($P < 0.01$, Dunnett's test)を表す。

考察

本論文では、まず新規に創製した PDE10A 阻害薬である PDM-042 の *in vitro* および薬物動態学的プロファイルを評価した。PDM-042 は種差無く PDE10A に対する優れた阻害活性を有し、他の PDE アイソザイムおよび標的分子に対する高い選択性、経口活性および良好な脳内移行性を有する PDE10A 阻害薬であることが明らかとなった。次に、複数のラットモデルを用いて PDM-042 が新規統合失調症治療薬となりうる可能性について検討した。PDM-042 は既存の抗精神病薬と同様に抗精神病様作用を示し、さらに認知機能改善作用を併せ持つことが明らかとなった。また、既存の抗精神病薬と比較して錐体外路症状は限定的であり、血中プロラクチン濃度の増加、血糖値の増加といった副作用のリスクは極めて低いことが示唆された。さらに、PDM-042 の認知機能改善作用および限定的な錐体外路症状にドパミン D₁ 受容体シグナルの活性化が関わっていることをドパミン D₁ 受容体アンタゴニストである SCH23390 を用いて明らかにした。

PDM-042 の抗精神病様作用を評価するために、はじめに MK-801 による自発運動量亢進作用に対する抑制作用を評価した。げっ歯類に MK-801 や phencyclidine などの NMDA 受容体拮抗薬を投与すると自発運動量の亢進が認められ、この自発運動量亢進作用に対して抗精神病薬が抑制作用を示すことから、NMDA 受容体拮抗薬による自発運動量亢進作用に対する抑制作用の評価は抗精神病様作用を有する薬物のスクリーニングに汎用されている (34, 35)。従って、PDM-042 の抗精神病様作用を評価するために、MK-801 による自発運動量亢進作用に対する PDM-042 の抑制作用を評価した。PDM-042 は MK-801 による自発運動量の亢進に対して 0.1 および 0.3 mg/kg の用量で有意な抑制作用を示した。PDM-042 は単独でこれらの用量において自発運動量に影響を与えなかったが、1 mg/kg では自発運動量を有意に減少させた。一方、既存の抗精神病薬である olanzapine は MK-801 による自発運動量の亢進に対して 1 および 3 mg/kg の用量で有意な抑制作用を示したものの、その作用は単独で自発運動量を有意に減少させる用量である 3 mg/kg においても部分的であった。これらの結果より、PDM-042 は olanzapine と同様に抗精神病様作用を示し、その最少有効用量が単独で自発運動量を有意に減少させる用量と比較して 10 倍低いことから、PDM-042 は PDE10A の抑制を介してグルタミン酸シグナル伝達を正常化していると考えられた。

次に条件回避反応試験を用いて PDM-042 の抗精神病様作用について評価した。既存の抗精神

病薬は条件回避反応試験において、フットショックに対する逃避行動には影響を与えずに条件回避反応を特異的に抑制し、その ED₅₀ が臨床における有効用量と相関することが知られている (36)。また、既存の抗精神病薬の臨床における有効性とヒトにおけるドパミン D₂ 受容体占有率の関係がラットにおける条件回避反応試験の抑制作用とドパミン D₂ 受容体占有率の関係と良好な相関を示す (37, 38) ことから、条件回避反応試験は臨床における薬効予測性の高い動物モデルであると考えられている (39)。従って、PDM-042 の条件回避反応抑制作用を評価することは、臨床における PDM-042 の有効性を予測するうえで大変重要な意義をもつと考えられる。PDM-042 は用量依存的に条件回避反応を抑制し、その作用は 0.3–1 mg/kg で有意であった。一方、risperidone および olanzapine も用量依存的に条件回避反応を抑制し、その作用はそれぞれ 0.1、0.2 mg/kg および 1、3 mg/kg で有意であった。また、いずれの薬物もフットショックに対する逃避行動そのものには影響を与えなかった。これらの結果から、PDM-042 は risperidone や olanzapine と同様に抗精神病様作用を示すことが強く示唆された。

続いて抗精神病様作用に加えて、PDM-042 の認知機能に対する作用について評価するために、新奇物体認識試験を用いて PDM-042 の認知機能改善作用について評価した。新奇物体認識試験はげっ歯類の新奇性を好むという習性を利用し、提示された物体に対する自発的な探索行動を記憶の指標として視覚認識記憶を評価する試験である (40)。これまで、米国立精神衛生研究所が中心となり発足したプロジェクトである MATRICS (Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia) により統合失調症患者で障害されている認知機能領域のうちの一つとして“視覚認知と記憶”が同定され (41)、新奇物体認識試験はこの“視覚認知と記憶”を反映した非臨床試験であると提唱されている (42)。新奇物体認識試験は長期間のトレーニングや報酬、嫌悪刺激などの正または負の強化因子を使用せずに実施が可能であり (40)、ヒトにおける認知機能評価試験の際にはこれらのトレーニングや強化因子は通常必要とされないため、認知機能に対する PDM-042 の作用の評価に新奇物体認識試験を選択した。獲得試行とテスト試行間のインターバルを 48 時間に設定するとラットは獲得試行で提示された物体を忘却していたことから、本研究においては獲得試行とテスト試行間のインターバルを 48 時間に設定して実施した。また、PDM-042 によるラットの物体探索行動への影響を除くために、PDM-042 を獲得試行直後に投与した。PDM-042 は用量依存的に物体認識記憶の指標である recognition index を増加させ、その作用は 1 および 3 mg/kg で有意であった。また、全ての試験用量において物体に対する総探

索時間に影響は認められなかった。これらの結果より、PDM-042 が物体認識記憶を特異的に増加させることが示唆された。本結果は PDE10A 阻害薬が獲得試行後の投与で物体認識記憶の増加作用を示した初めての報告である。これまでに PDE10A に対する高い阻害活性および選択性、経口活性を有する構造の異なる PDE10A 阻害薬である THPP-1、SEP-39 および TAK-063 が物体認識記憶の増加作用を示すことが報告されているが、THPP-1 や TAK-063 は獲得試行前に投与され (25, 28)、SEP-39 は獲得試行およびテスト試行前に投与された (27)。これらの報告と本研究の結果を併せると、PDE10A 阻害薬が獲得試行前および獲得試行直後の投与タイミングで物体認識記憶の増加作用を示すことが明らかとなり、PDE10A 阻害薬が物体認識記憶の獲得と保持の両方に関与している可能性が示唆された。

PDM-042 が新奇物体認識試験において認知機能改善作用を示すことが明らかとなったが、PDE10A 阻害薬の認知機能改善作用に対するドパミン D₁ 受容体シグナルの関与についてはほとんど報告がなく、不明な点が多い。認知機能障害に対する改善作用を有する統合失調症治療薬の臨床アンメットニーズは非常に高いことから、PDE10A 阻害薬の認知機能改善作用のメカニズムを検討することは重要であると考えられる。そこで、私は PDE10A 阻害薬の認知機能改善作用にドパミン D₁ 受容体シグナルの活性化が寄与している可能性を検討するために、PDM-042 の物体認識記憶の増加作用におけるドパミン D₁ 受容体シグナルの関与についてドパミン D₁ 受容体アンタゴニストである SCH23390 を用いて行動薬理的に検討した。

PDM-042 は 3 mg/kg において物体認識記憶を有意に増加させ、この物体認識記憶の増加作用に対して、SCH23390 は 0.1 mg/kg の用量で有意な拮抗作用を示した。全ての投与群間において獲得試行およびテスト試行の両方で物体への総探索時間には違いが認められず、PDM-042 および SCH23390 の血漿中および脳内濃度は両薬物の単独、併用に関わらず同程度であった。従って、PDM-042 の物体認識記憶の増加作用に対する SCH23390 の抑制作用は運動機能の抑制や両薬物の薬物動態学的な変化によるものではなく、ドパミン D₁ 受容体シグナルの抑制による薬理的な作用によるものであると考えられた。本結果より、PDM-042 による物体認識記憶の増加作用にドパミン D₁ 受容体シグナルの活性化が関与していることが示唆された。本論文では、PDM-042 とドパミン D₁ 受容体シグナルが相互作用している脳部位の同定までには至っていないが、これまでに報告されたドパミン D₁ 受容体リガンドを用いた新奇物体認識試験の結果や、PDE10A の脳内における発現分布より、皮質や線条体が関与している可能性が高いと考えている。げっ歯類

において、ドパミン D₁ 受容体アゴニストである SKF38393 や SKF81297 が物体認識記憶を増加させたことが報告されており (31, 32, 43)、また、SCH23390 のマウスの皮質への局所投与により、短期および長期の物体認識記憶の障害が報告されている (44, 45)。これらの結果より、げっ歯類において皮質のドパミン D₁ 受容体シグナルが物体認識記憶に重要であることが示唆される。従って、PDM-042 による物体認識記憶の増加は皮質におけるドパミン D₁ 受容体シグナルの活性化によるものかもしれない。一方で、PDE10A は線条体で高発現であるため、PDM-042 が線条体中の PDE10A を阻害することによって間接的に皮質を活性化している可能性も否定できない。線条体と皮質は解剖学的、神経機能的に接続しており、皮質-線条体ループを形成している (16, 17)。この皮質-線条体ループが運動機能だけでなく、学習記憶にも重要であることが示唆されており (46)、げっ歯類において直接路および間接路におけるドパミン D₁ 受容体シグナルおよびドパミン D₂ 受容体シグナルの調節が学習記憶に関与することが報告されている (47, 48)。これらの報告より、線条体におけるドパミンシグナルの調節が皮質における記憶学習機構に影響を与えている可能性が示唆される (49)。従って、PDM-042 の物体認識記憶の増加作用に関わる脳部位を同定するためには、皮質や線条体に局所投与された PDM-042 が物体認識記憶を亢進させるか否かを検討することが今後必要であろう。

最近、Nikiforuk らにより、PDM-042 とは構造の異なる PDE10A 阻害薬である MP-10 がラットを用いた注意セットシフト試験により認知機能改善作用を示すが、この作用に対して SCH23390 が抑制作用を示さないということが報告された (50)。この報告は本論文の結果と一致していないが、その理由として、新奇物体認識試験と注意セットシフト試験では評価している認知機能領域が異なっていることが挙げられる。MATRICS により新奇物体認識試験は統合失調症患者で障害されている“視覚的学習と記憶”を反映する非臨床試験として同定されている一方で、注意セットシフト試験は“推論と問題解決”を反映する非臨床試験として同定されている (41)。これらの報告より、PDE10A 阻害薬による認知機能改善作用に対するドパミン D₁ 受容体シグナルの関与が認知機能領域によって異なっていることが示唆される。従って、PDM-042 の異なる認知機能領域に対する作用およびドパミン D₁ 受容体シグナルの関与を検討するために、新奇物体認識試験とは異なる認知機能領域を評価可能な注意セットシフト試験等における PDM-042 の評価が今後必要であろう。

新規統合失調症治療薬の開発において、抗精神病様作用や認知機能改善作用の化合物の有効性

の評価に加えて、臨床で問題となっている副作用リスクを実験的に検証することも重要である。従って、既存の抗精神病薬の主な副作用である錐体外路症状、血中プロラクチン濃度および血糖値に対する PDM-042 の作用を評価し、olanzapine や risperidone と比較した。

錐体外路症状は既存の抗精神病薬の代表的な副作用の一つであり、非臨床において錐体外路症状を評価する試験としてカタレプシー試験が汎用されている (51)。カタレプシーとは、ラットに不自然姿勢を取らせ、その姿勢を長時間維持する症状を指し、被験薬物によるカタレプシー持続時間が錐体外路症状の指標となる。PDM-042 と非定型抗精神病薬の錐体外路症状について比較するために、カタレプシー試験を用いて PDM-042 および olanzapine を評価した。PDM-042 は 1-10 mg/kg で有意なカタレプシー持続時間の増加を示したものの、その増加作用は 1 mg/kg で最大であり、10 mg/kg まで用量依存性は認められなかった。一方、olanzapine は 1-10 mg/kg で有意なカタレプシー持続時間の増加を示した。これらの結果より、PDM-042 は olanzapine と異なり条件回避反応における最小有効用量 (0.3 mg/kg) の 30 倍の用量 (10 mg/kg) においても錐体外路症状の発現は限定的であることが示された。PDM-042 は既存の抗精神病薬と同様に抗精神病様作用を示し、カタレプシーを増加させたことから、恐らくこれらの作用にはドパミン D₂ 受容体アンタゴニスト様作用が関与していると考えられる。一方で、PDE10A が線条体の直接路と間接路の両方に発現していることから、PDM-042 の限定的なカタレプシー増加作用に対してもドパミン D₁ 受容体シグナルの活性化が関与している可能性が高い。従って、この限定的なカタレプシー増加作用に対するドパミン D₁ 受容体シグナルの関与について、SCH23390 を用いて検討した。その結果、PDM-042 の 1 mg/kg におけるカタレプシー増加作用は SCH23390 により用量依存的に亢進し、その作用は 0.01、0.03 mg/kg で有意であった。これらの用量における SCH23390 単独のカタレプシー持続時間の増加作用は軽微であるため、SCH23390 による PDM-042 のカタレプシー持続時間の亢進作用は各薬物の単なる相加効果ではないことが示唆された。それ故、PDM-042 の限定的なカタレプシー増加作用に少なくともドパミン D₁ 受容体シグナルの活性化が関与していることが示唆された。これまでに MP-10 によるカタレプシー増加作用が SCH23390 により亢進し (30)、haloperidol によるカタレプシー増加作用が MP-10 やドパミン D₁ 受容体アゴニストである SKF82958 により減弱する (26, 30) という報告があり、本結果はこれらの報告と一致するものであった。以上のことより、PDE10A 阻害薬のドパミン D₁ 受容体アゴニスト様作用が自身のドパミン D₂ 受容体アンタゴニスト様作用と相反し、結果的にカタレプシー増加作用が限定的に

なっていると考えられた。

臨床研究により、抗精神病薬の中でも risperidone は血中プロラクチン濃度増加のリスクの最も高い抗精神病薬の一つであることが知られている (5, 6)。一方、olanzapine は抗精神病薬の中でも血糖値増加リスクが高く (5, 7)、糖尿病患者および糖尿病既往歴のある患者には禁忌である。従って、本研究では PDM-042 の血中プロラクチン濃度と血糖値への影響をそれぞれ risperidone、olanzapine と比較した。PDM-042 は条件回避反応における最小有効用量 (0.3 mg/kg) の 10 倍の用量 (3 mg/kg) まで血中プロラクチン濃度および血糖値に影響をおよぼさなかった。一方、risperidone は条件回避反応における最小有効用量である 0.1 mg/kg において有意に血中プロラクチン濃度を増加させ、olanzapine は条件回避反応における最小有効用量 (1 mg/kg) の 10 倍の用量 (10 mg/kg) において有意に血糖値を増加させた。以上の結果から、PDM-042 の血中プロラクチン濃度および血糖値への影響は極めて少なく、risperidone や olanzapine と比較して広い安全域を有することが示唆された。

これまでの結果より、PDM-042 が risperidone や olanzapine と同様に抗精神病様作用を有することを示したが、これらの抗精神病様作用が *in vivo* において PDE10A を介しているか否かは不明であった。従って、PDM-042 をトリチウム標識した [³H]PDM-042 を創製し、PDM-042 の薬理作用が PDE10A を介したものであるか否かを検討するとともに、PDM-042 の用量とラット線条体の PDE10A 占有率の関係について評価した。ラット線条体膜画分を用いた結合試験において、[³H]PDM-042 は K_d が 8.5 nM、 B_{max} が 7.2 pmol/mg protein と、PDE10A に対して高い親和性を示し、特異的結合は濃度依存的かつ飽和的であった。また、結合阻害試験において PDM-042 および構造の異なる PDE10A 阻害薬である MP-10 が濃度依存的に [³H]PDM-042 の線条体の PDE10A に対する特異的結合を減少させた。これらの結果より、[³H]PDM-042 がラット線条体の PDE10A に特異的に結合する放射性リガンドとして *in vivo* における PDE10A 占有率試験に使用可能なトリチウム標識体であることが明らかとなった。次に、PDM-042 の抗精神病様作用と線条体中 PDE10A の占有率との関係を検討するために、ラットに経口投与した PDM-042 の線条体中 PDE10A の占有率について評価した。PDM-042 は線条体中の PDE10A の占有率を用量依存的に増加させ、3 mg/kg における占有率は 86.6% であった。PDM-042 の用量とそれぞれの用量における PDE10A 占有率の関係曲線を用いて、PDM-042 の抗精神病様作用と PDE10A 占有率の関係を算出すると、PDM-042 の条件回避反応試験における ED₅₀ である 0.44 mg/kg および、最大作用を

示すと考えられる 1 mg/kg における PDE10A 占有率はそれぞれ 39、66%であった。従って、ラットにおいて、PDM-042 が抗精神病様作用を発揮するために必要な線条体中 PDE10A の占有率は約 40-70%であると考えられた。

総括

本研究では、新規 PDE10A 阻害薬である PDM-042 の統合失調症治療薬としての可能性を複数のラットモデルを用いて検討した。

抗精神病様作用の評価に汎用されている MK-801 による自発運動亢進作用に対する抑制試験および条件回避反応試験の結果より、PDM-042 は既存の統合失調症治療薬である risperidone や olanzapine と同様に抗精神病様作用を示すことが明らかとなった。

また、新奇物体認識試験の評価結果において、PDM-042 は 48 時間という長時間のインターバルを設定することにより自然忘却させたラットの物体認識記憶を用量依存的に増加させた。また、この評価の際、PDM-042 は獲得試行後に投与されているため、PDM-042 が記憶の保持に関与していることが示唆された。しかしながら、PDM-042 の統合失調症のモデル動物における認知機能改善作用については検討していないため、PDM-042 の統合失調症における認知機能障害に対する有効性をさらに検証するためには、phencyclidine 等の NMDA 受容体拮抗薬による認知機能障害モデル動物を用いた検討が必要であろう。

PDM-042 の有効性の評価に加えて、既存の抗精神病薬の主な副作用である錐体外路症状、血中プロラクチン濃度、血糖値への影響について評価し、olanzapine や risperidone と比較した。PDM-042 は既存の抗精神病薬と比較して錐体外路症状は限定的であり、血中プロラクチン濃度の増加、血糖値の増加といった代謝性副作用のリスクはほとんどないと考えられた。

次に、ドパミン D₁ 受容体アンタゴニストである SCH23390 を用いた新奇物体認識試験の結果より、PDM-042 の認知機能改善作用に少なくともドパミン D₁ 受容体シグナルが関わっていることが初めて明らかとなった。ドパミン D₁ 受容体シグナルの活性化は統合失調症における認知機能障害に対する新たな治療アプローチとして注目されており、少数例の試験ではあるものの、ドパミン D₁ 受容体アゴニストである DAR-0100A が統合失調症患者の作業記憶障害を改善したという臨床報告もある (33)。一方、ドパミン D₁ 受容体アゴニストは非臨床においては高用量で認知機能改善作用を減弱させることが示唆されており (32)、臨床においては低血圧やジスキネジア等の副作用を発現することが問題となっている (52, 53)。従って、受容体脱感作による有効性の減弱や安全性懸念が克服されておらず、現在のところ臨床で使用可能な治療薬の開発に至っていない。PDE10A 阻害薬はドパミン D₁ 受容体の下流において間接的にドパミン D₁ 受容体シグナ

ルを活性化させるため、上記のような問題点を回避できる可能性があり、今後の臨床試験において、PDE10A 阻害薬の統合失調症の認知機能障害に対する改善作用が注目される。

さらに SCH23390 を用いたカタレプシー試験の結果より、PDM-042 の限定的な錐体外路症状に少なくともドパミン D₁ 受容体シグナルの活性化が関与していることが示唆された。本結果より、PDM-042 はドパミン D₂ 受容体アンタゴニスト様作用によりカタレプシーを発現するが、用量を増加させるとドパミン D₁ 受容体アゴニスト様作用の寄与が大きくなり、線条体出力における間接路の抑制強化系が直接路の脱抑制系にて解除されるため、錐体外路症状の発現が抑制されると考えられた。新奇物体認識試験の結果も併せると、PDE10A 阻害薬のドパミン D₁ 受容体シグナルの活性化は認知機能改善作用と限定的な錐体外路症状に関与しており、統合失調症のアンメットニーズである認知機能障害に対する改善作用と副作用の減弱に寄与できるユニークな作用機序であることが示唆された。

PDM-042 の薬理作用が PDE10A を介したものであるかを評価するために、放射性標識体である [³H]PDM-042 を用いて、PDM-042 のラット線条体における PDE10A 占有率を評価した。PDM-042 は用量依存的に PDE10A 占有率を増加させ、条件回避反応試験において抗精神病様作用を示す用量における PDE10A 占有率は約 40-70%であることが明らかとなった。このような *in vivo* における PDE10A 占有率は臨床における投与量予測だけでなく、薬効および副作用予測にも有用であるため、今後の PDM-042 の開発においては、血中濃度や CSF 中濃度等の薬物動態学的パラメーターを組み合わせた詳細な解析が必要であろう。

本論文において、PDM-042 が優れた *in vitro* および薬物動態学的プロファイルを有する新規 PDE10A 阻害薬であり、抗精神病様作用および認知機能改善作用を有することが明らかとなった。また、既存の抗精神病薬で問題となっている錐体外路症状や代謝性副作用リスクは低い可能性が示唆された。さらに、PDM-042 の認知機能改善作用および限定的な錐体外路症状にドパミン D₁ 受容体シグナルが関与していることが示唆された。これらの結果より、PDE10A 阻害薬は陽性症状から認知機能改善作用まで幅広い薬効を有し、副作用リスクの低い新規統合失調症治療薬になりうると期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 池谷 裕二 教授ならびに持田製薬株式会社総合研究所 前原 俊介 マネジャーに謹んで感謝いたします。

本論文を作成するにあたり、有益なご助言とご校閲を賜りました東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学教室 村田 茂穂 教授、東京大学大学院薬学系研究科免疫・微生物学教室 堀昌平 教授、東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室 楠原 洋之 教授ならびに東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 小山 隆太 准教授に心から感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、ご協力を賜りました持田製薬株式会社医薬開発本部 千田 昇 主席ならびに持田製薬株式会社総合研究所の皆様へ深く感謝いたします。また、本研究および本論文の作成において、温かく見守ってくれた家族に心から感謝いたします。

最後に、本研究を遂行するにあたり、数多くの尊い命を捧げてくれた動物たちに深く感謝いたします。

実験項

使用動物

Sprague-Dawley 雄性ラットおよび F344 雄性ラットは日本チャールス・リバー株式会社 (Kanagawa, Japan) または日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) から、ビーグル雄性犬はマール・バイオリソース社 (Beijing, China) から購入した。全ての動物は $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ の温度と $55 \pm 15\%$ の湿度に保たれた部屋で 7:30 から 19:30 までを明期、19:30 から 7:30 までを暗期とした明暗サイクルの環境下で飼育した。動物の搬入後、1 ケージあたりの匹数は Sprague-Dawley ラットは 3-4 匹、F344 ラットは 2-4 匹の群飼育とし、ビーグル犬は 1 匹ずつの個別飼育とした。水と餌 (ラットは CE-2 で日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) から購入し、イヌは 250 g/day の DS-A でオリエンタル酵母株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した) は自由に摂取させ、動物の搬入から少なくとも 7 日間は実験実施前の実験施設での馴化期間とした。また、実験開始前に測定室に少なくとも 1 時間馴化した。全ての動物実験は持田製薬創薬研究所実験動物倫理委員会の承認のもとで行われた。

試薬および化合物

PDM-042 は持田製薬株式会社創薬研究所で、 $[^3\text{H}]$ PDM-042 は積水メディカル株式会社 (Tokyo, Japan) で合成された。Olanzapine は米国薬局方協会 (U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD) から、risperidone は Toronto Research Chemicals 社 (Toronto, Canada) から、MP-10 (2-[4-(1-methyl-4-pyridin-4-yl-1H-pyrazol-3-yl)-phenoxy]methyl-quinoline) は Hande Sciences 社 (Suzhou, China) から購入した。MK-801 ((5R,10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate) および SCH23390 ((*R*)-(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride) は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO) から購入した。投与薬液調製の溶媒として用いた生理食塩水は株式会社大塚製薬工場 (Tokushima, Japan) から、0.5 w/v% メチルセルロース 400 溶液、塩酸、*N,N*-ジメチルアセトアミド、およびポリエチレングリコール 400 は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。その他の試薬は生化学、分子生物学あるいは分析用グレードのものを使用した。

被験薬物の調製

PDM-042 は *in vitro* アッセイで用いる場合はジメチルスルホキシドに溶解し、 -20°C でアッセイ実施まで保管した。経口投与で用いる場合はメノウ乳鉢と乳棒を用いて 0.5 w/v% メチルセルロース 400 溶液に懸濁して調製した。静脈内投与で用いる場合は *N,N*-ジメチルアセトアミドとポリエチレングリコール 400 の 50% (v/v) 混合溶液に溶解して調製した。Risperidone と olanzapine はそれぞれ必要最少量の 1 規定または 0.1 規定の塩酸によりそれぞれ溶解した後、目的濃度になるまで生理食塩水で希釈して調製した。MK-801 および SCH23390 は生理食塩水に溶解して調製した。全ての投与薬液は実験の直前に調製した。

薬物投与

PDM-042 については 5 mL/kg の容量で経口投与を用いた。ただし、薬物動態学的プロファイルの確認試験時では、1 mL/kg の容量で静脈内投与を用いた。Risperidone、olanzapine、MK-801 および SCH23390 については 1 mL/kg の容量で皮下投与を用いた。各薬物において使用した用量および投与タイミングは各グラフや表に記載した。

蛍光基質を用いた PDM-042 のアッセイ評価

ヒトおよびラットの組換え PDE10A は BPS Bioscience 社 (San Diego, CA) から購入した。IMAP TR-FRET Screening Express アッセイキットは Molecular Devices 社 (Sunnyvale, CA) から購入した。PDE10A に対する阻害活性 (IC_{50}) 評価は quadruplicate で、阻害定数 (K_i) 評価は duplicate で実施した。阻害活性評価の際は、まず PDM-042 (0.003–10 nM) およびヒト組換え PDE10A またはラット組換え PDE10A を室温で 5 分間インキュベーションし、フルオロセインでラベルされた cAMP (100 nM) を加え、室温で 60 分間インキュベーションした。IMAP binding 溶液を加え、室温で 3 時間以上インキュベーションし、ARVO-Sx (Perkin Elmer 社, Waltham, MA) を用いて蛍光シグナルを測定し、 IC_{50} を算出した。 IC_{50} は酵素が存在しないコントロールの値を最大阻害率 (100%)、PDM-042 が存在しないコントロールの値を 0% として算出した。また、阻害定数評価の際は、PDM-042 (0.03–30 nM) およびヒト組換え PDE10A またはラット組換え PDE10A を室温で 5 分間インキュベーションし、フルオロセインでラベルされた cAMP (ヒト PDE10A に対する K_i 評価時は 3–1000 nM、ラット PDE10A に対する K_i 評価時は 3–3000 nM) を加え、室温で 0 分間または

60 分間インキュベーションした。IMAP binding 溶液を加え、室温で 3 時間以上インキュベーションし、ARVO-Sx を用いて蛍光シグナルを測定した。インキュベーション時間が 60 分の時の値と 0 分の時の値の差分を用いて GrahPad Prism Software, ver 5.0 (GraphPad Software 社, San Diego, CA)により K_i を算出した。

PDM-042 の PDE 選択性とオフターゲット活性

各 PDE に対する選択性は PDE Selectivity Screen (Ricerca Biosciences 社, Concord, OH)を用いて PDM-042 の 1 μ M における各 PDE アイソザイム (ヒト PDE1A、ヒト PDE2A、ヒト PDE3A、ヒト PDE4A1A、ヒト PDE4B1、ヒト PDE5A、ウシ PDE6、ヒト PDE7A、ヒト PDE7B、ヒト PDE8A1、ヒト PDE9A2、ヒト PDE10A2、ヒト PDE11A4)に対する阻害活性を確認した。神経伝達物質受容体、酵素、イオンチャネル、各種トランスポーターなどの 137 個の分子標的に対する選択性は Cerep BioPrint® In Vitro Pharmacology Profiling (Cerep 社, l'Evescault, France)を用いて PDM-042 の 10 μ M における結合活性を確認し、結合活性が認められた標的に対しては機能アッセイによりアゴニスト、アンタゴニスト活性の有無を確認した。

PDM-042 の薬物動態学的プロファイル

PDM-042 の薬物動態学的プロファイルは Sprague-Dawley 雄性ラットおよびビーグル雄性犬を用いて取得した。ただし、脳内移行性の試験には F344 雄性ラットを用いた。PDM-042 をラットおよびイヌに 0.3 mg/kg で経口投与、または 0.1 mg/kg で静脈内投与し、経時的に血液を採取した。遠心分離により血漿を取得後、液体クロマトグラフ質量分析を用いて血漿中の PDM-042 の濃度を定量した。また、PDM-042 をラットに投与後 60 分の時点で両側の線条体を採取し、破碎後、遠心分離により上清を取得し、液体クロマトグラフ質量分析を用いて線条体中の PDM-042 の濃度を定量した。同時に血漿中濃度も上記のように取得し、PDM-042 の投与 60 分後における線条体中濃度と血漿中濃度の比を算出した。各薬物動態学的パラメーターは WinNolin ver 6.2 (Pharsight 社, Palo Alto, CA)を用いて算出した。

[³H]PDM-042 を用いたラット線条体膜画分における PDM-042 の結合試験

ラット線条体膜画分の調製は Kotera ら (54)の方法を一部改変して実施した。Sprague-Dawley

雄性ラットの両側線条体を採取し、コンプリートプロテアーゼインヒビターカクテル (EDTA-free, Roche Diagnostics (Indianapolis, IN))を添加し、氷冷した HB-A バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM Mg(CH₃COO)₂, 0.3 mM CaCl₂, 1 mM dithiothreitol)中で破碎した。得られたホモジネートを 100,000g、4°C で 60 分間遠心分離した。沈殿物を氷冷した HBT-A バッファー (HB-A バッファーに 0.5%の濃度になるように Triton X-100 を添加して作製したバッファー)中で破碎し、4°C で 30 分間インキュベーション後、100,000g、4°C で 60 分間遠心分離した。得られた上清を分注し、膜画分として-80°C で冷凍保存した。膜画分中の蛋白質濃度はウシ血清アルブミンをスタンダードとして、Lowry 法により決定した。

飽和結合試験は 96 ウェル MultiScreen FB GF/B フィルタープレート (Millipore 社, Billerica, MA) を用いて、duplicate で実施した。^[3H]PDM-042 (0.78–50 nM)をバッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM Mg(CH₃COO)₂, 0.3 mM CaCl₂)中で、上記で取得した膜画分 (50 µg/well)とともに室温で 60 分間インキュベーションした後、フィルタープレートを用いて結合型と遊離型の^[3H]PDM-042 を分離した。その後液体シンチレーションカクテルを添加し、フィルターにトラップされた放射活性を液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 2910TR, Perkin Elmer)で測定した。結合阻害試験においては、PDM-042 (0.1 pM–1µM)または MP-10 (0.1 pM–1µM)に飽和結合試験における EC₈₀ 相当の濃度である 15 nM の^[3H]PDM-042 をバッファー中に加え、膜画分 (50 µg/well)とともに室温で 60 分間インキュベーションし、上記と同様に放射活性を測定した。非特異的結合は 10 µM の PDM-042 の存在下で測定された放射活性と定義し、^[3H]PDM-042 の特異的結合は総放射活性から非特異的結合の値を除くことにより求めた。解離定数 (K_d)および特異的結合の最大値 (B_{max})は GraphPad Prism Software, ver 5.0 を用いて算出した。

^[3H]PDM-042 を用いたラット線条体における PDM-042 の PDE10A 占有試験

PDM-042 のラット線条体における PDE10A の占有試験には F344 雄性ラットを用いた。ラットに PDM-042 (0.1–3 mg/kg)を経口投与した 50 分後に^[3H]PDM-042 (0.3 µCi/0.2 mL/ラット)を静脈内投与し、その 10 分後に両側の線条体を採取した。採取した線条体は重量測定後、氷冷したバッファー (25 mM sodium phosphate, pH 7.4)中で破碎し、ホモジネートを Whatman GF/B フィルターを用いて吸引濾過した。その後、フィルターをバッファーで 2 回洗浄し、液体シンチレーションカクテルを添加後、フィルターにトラップされた放射活性を Tri-Carb 2910TR (Perkin Elmer)で

測定した。非特異的結合は 30 mg/kg の PDM-042 を経口投与したラットの線条体ホモジネートにおける放射活性と定義し、 $[^3\text{H}]$ PDM-042 の特異的結合は各線条体ホモジネートに対する全結合から非特異的結合を除くことによって求めた。PDM-042 のラット線条体における PDE10A の占有率は PDM-042 を投与したラットの線条体における特異的結合および vehicle を投与したラットの線条体における特異的結合から、以下の式で算出した。

$$\text{PDE10A 占有率 (\%)} = 100 \times \{1 - (\text{PDM-042 投与群の特異的結合} / \text{vehicle 投与群の特異的結合})\}$$

PDM-042 の PDE10A 占有率曲線は GraphPad Prism Software, ver 5.0 を用いてフィッティングを実施した。

自発運動量測定試験

自発運動量測定試験には Sprague-Dawley 雄性ラットを用いた。試験時はラットを 60 分以上測定室の環境に馴化させた。PDM-042 または olanzapine の単独の自発運動量に対する作用の評価の際は、PDM-042 または olanzapine を投与し、プラスチックケージ (内寸; 27.0W × 44.0D × 18.7H cm) に移し、直後から 60 分間の自発運動量をスーパーメックス (室町機械株式会社, Tokyo, Japan) を用いて持続的に測定した。MK-801 による自発運動量亢進に対する拮抗作用の評価の際は、PDM-042 または olanzapine の投与 60 分後に MK-801 を投与し、プラスチックケージ (内寸; 27.0W × 44.0D × 18.7H cm) に移した直後から 60 分間の自発運動量を持続的に測定した。

条件回避反応試験

条件回避反応試験には F344 雄性ラットを用いた。防音のチャンバー (MED Associates 社, St. Albans, VT) 内に透明の蓋ありアクリルボックス (片側の内寸; 20.3W × 15.9D × 21.3H cm、片側) を設置した。2つのボックスはギロチンドアで仕切られており、ラットをボックスに入れるとギロチンドアが開くようにした。床は shock scrambler に接続されているステンレス製グリッドを用いて、フットショックを負荷できるようにした。

ラットを測定ボックスの左側に入れ、直後から条件回避反応の測定を開始した。条件刺激 (CS) には 80 dB の音刺激および光刺激 (10 秒間) を、非条件刺激 (UCS) には 0.8 mA のフットショック (10 秒間) を用いた。CS の提示後 UCS を負荷する一連のパラダイムを 1 トライアルとし、1 トライアルごとのラットの回避反応を以下の指標を基に測定した。

Avoidance; CS の間に隣室へ移動した

Escape; CS の間には移動せず、UCS の間に隣室へ移動した

Escape failure; CS および UCS の間に隣室へ移動しなかった

1 匹あたりトライアルを 30 回実施し、30 トライアル中の avoidance、escape、escape failure の回数からそれぞれの割合 (%)を算出した。トライアル間のインターバルは平均して 15 秒となるように、7.5–22.5 秒間の間でランダムに設定した。3 日間連続して 80%以上の avoidance rate を示した個体を選抜して被験薬物の評価に使用した。PDM-042 の投与 60 分後、olanzapine の投与 30 分後、または risperidone の投与 30 分後に条件回避反応を測定した。30 トライアル中の avoidance、escape、escape failure の回数からそれぞれの割合 (%)を算出し、各薬物投与群の平均値を算出した。

新奇物体認識試験

新奇物体認識試験には Sprague–Dawley 雄性ラットを用いた。測定用のボックスには飼育用床敷を敷き詰めた塩化ビニル製の灰色ボックス (内寸; 60W × 60D × 35H cm)を用いた。2 種類の物体には青色の蓋付きの透明なガラス瓶 (高さ; 約 15 cm)または茶色の蓋付きの褐色のガラス瓶 (高さ; 約 15 cm)を用いた。獲得試行の前日にボックスにラットを入れ、10 分間自由に探索させることにより測定環境に馴化させた。獲得試行では同じ種類の 2 つの物体をボックス内に設置し、ラットを 3 分間自由に探索させた。物体への自由探索はボックス上部に設置したビデオカメラで撮影し、その映像をもとに各物体への探索時間を測定した。獲得試行終了後、ラットをボックスから取り出し、被験薬物を投与した後に飼育ケージに戻し、獲得試行の 48 時間後にテスト試行を実施した。テスト試行では獲得試行で提示した片方の物体を異なる種類の新奇物体に置き換えて設置し、ラットを 3 分間自由に探索させ、各物体への探索時間を測定した。ラットが物体から 1 cm 以下の距離で鼻を物体に向ける、あるいはラットの鼻が物体に接した場合を物体に対する探索行動とみなし、ラットが物体によじ登る、物体の周囲を回るような行動は探索行動とはみなさなかった。獲得試行およびテスト試行において薬物の投与群を知らない測定者が各物体への探索時間を測定した。また、使用した 2 種類の物体への嗜好性の偏りが無いことを確認し、それぞれの物体の組み合わせおよび位置に偏りが生じないように割り当てた。物体やボックス内の臭いの影響を排除するために、それぞれの試行ごとに敷き詰めたチップをかき混ぜ、物体を 70%の

エタノールで清拭した。データ解析は以下の式で recognition index (%)を算出した。ただし、獲得試行またはテスト試行において、各物体への探索時間が1秒未満である個体および両物体への総探索時間が10秒未満である個体はデータとして採用しなかった。

$$\text{Recognition index (\%)} = \frac{\text{新奇物体に対する探索時間 (秒)}}{\text{両物体への総探索時間 (秒)}}$$

カタレプシー試験

カタレプシー試験には Sprague-Dawley 雄性ラットを用いた。ラットの両前肢を床面から約 10 cm の高さに設置したバーに置くことにより不自然姿勢を取らせ、その持続時間をカタレプシー持続時間と定義して測定した。カットオフは90秒に設定した。PDM-042の投与60分後、olanzapineの投与30分後、またはSCH23390の投与30分後にカタレプシー持続時間を測定した。PDM-042のカタレプシー増加作用に対するSCH23390の作用の評価時はPDM-042の投与30分後にSCH23390を投与し、SCH23390の投与30分後にカタレプシー持続時間を測定した。

血中プロラクチン濃度

血中プロラクチン濃度の測定には Sprague-Dawley 雄性ラットを用いた。PDM-042の投与60分後またはrisperidoneの投与30分後に血液を採取し、遠心分離により血漿を得た。血漿中のプロラクチン濃度をRAT PROLACTIN ENZYME ASSAY KIT (SPI-BIO社, Montigny le Bretonneux, France)を用いて測定した。

血糖値

血糖値の測定には Sprague-Dawley 雄性ラットを用いた。試験前日に絶食処理を施したラットにPDM-042またはolanzapineを投与し、60分後にグルコース (2 g/kg)を腹腔内投与した。グルコース投与5分前、投与15、30、60、120分後に血液を採取し、遠心分離により血漿を得た。血漿中グルコース濃度をグルコースCIIテストワコー (和光純薬工業株式会社)により測定し、各薬物投与群の血漿中グルコース濃度のAUCを台形法で算出した。

データ表記および統計処理

数値は平均値 ± 標準誤差で示したが、薬物動態学的プロファイルは平均値 ± 標準偏差で示し、IC₅₀、K_i、³H]PDM-042 の特異的結合および PDE10 占有率は平均値で示した。二群間の比較には *t*-test、多群間の比較には一元配置分散分析 (one-way analysis of variance) を用いて解析した後に、post-hoc comparison test (Dunnett の多重比較検定) を実施した。ただし、条件回避反応試験およびカタレプシー試験では二群間の比較には Wilcoxon のノンパラメトリック検定、多群間の比較には Steel のノンパラメトリック検定を実施した。また、新奇物体認識試験における SCH23390 の拮抗作用の比較には Bonfferoni の全群比較を実施した。各試験で統計解析に用いた方法はそれぞれの図の説明箇所に記載した。全ての統計解析において、有意水準を 5% 未満として検定した。

尚、本論文の一部は以下のように公表した。

論文発表

1. Arakawa K, Maehara S, Yuge N, Ishikawa M, Miyazaki Y, Naba H, Kato Y, Nakao K. Pharmacological characterization of a novel potent, selective, and orally active phosphodiesterase 10A inhibitor, PDM-042 [(E)-4-(2-(2-(5,8-dimethyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrazin-2-yl)vinyl)-6-(pyrrolidin-1-yl)pyrimidin-4-yl)morpholine] in rats: potential for the treatment of schizophrenia. *Pharmacology Research and Perspectives*. 4 (4), e00241, 2016.
2. Arakawa K, Nakao K, Maehara S. Dopamine D₁ signaling involvement in the effects of the phosphodiesterase 10A inhibitor, PDM-042 on cognitive function and extrapyramidal side effect in rats. *Behavioural Brain Research*. 317 (15), 204–209, 2017.

参考文献

1. Green MF. What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia? *Am J Psychiatry*. 153 (1996) 321–330.
2. Green MF, Kern RS, Heaton RK. Longitudinal studies of cognition and functional outcome in schizophrenia: implications for MATRICS. *Schizophr Res*. 72 (2004) 41–51.
3. van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet*. 374 (2009) 635–645.
4. Pierre JM. Extrapyramidal symptoms with atypical antipsychotics : incidence, prevention and management. *Drug Saf*. 28 (2005) 191–208.
5. Krebs M, Leopold K, Hinzpeter A, Schaefer M. Current schizophrenia drugs: efficacy and side effects. *Expert Opin Pharmacother*. 7 (2006) 1005–1016.
6. Dunlop BW, Sternberg M, Phillips LS, Andersen J, and Duncan E. Disturbed glucose metabolism among patients taking olanzapine and typical antipsychotics. *Psychopharmacol Bull*. 37 (2003) 99–117.
7. Peuskens J, Pani L, Detraux J, and De Hert M. The effects of novel and newly approved antipsychotics on serum prolactin levels: a comprehensive review. *CNS Drugs*. 28 (2014) 421–453.
8. Bender AT and Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*. 58 (2006) 488–520.
9. Fujishige K, Kotera J, and Omori K. Striatum- and testis-specific phosphodiesterase PDE10A isolation and characterization of a rat PDE10A. *Eur J Biochem*. 266 (1999) 1118–1127.
10. Xie Z, Adamowicz WO, Eldred WD, Jakowski AB, Kleiman RJ, Morton DG, et al. Cellular and subcellular localization of PDE10A, a striatum-enriched phosphodiesterase. *Neuroscience*. 139 (2006) 597–607.
11. Lakics V, Karran EH, Boess FG. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology*. 59 (2010) 367–374.
12. Seeger TF, Bartlett B, Coskran TM, Culp JS, James LC, Krull DL, et al. Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Res*. 985 (2003) 113–126.
13. Coskran TM, Morton D, Menniti FS, Adamowicz WO, Kleiman RJ, Ryan AM, et al.

- Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 10A in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem.* 54 (2006) 1205–1213.
14. Loughney K, Snyder PB, Uher L, Rosman GJ, Ferguson K, and Florio VA. Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene.* 234 (1999) 109–117.
 15. Soderling SH, Bayuga SJ, and Beavo JA. Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (1999) 7071–7076.
 16. Graybiel AM. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 13 (1990) 244–254.
 17. Graybiel AM. The basal ganglia. *Curr Biol.* 10 (2000) R509–R511.
 18. Nishi A and Snyder GL. Advanced research on dopamine signaling to develop drugs for the treatment of mental disorders: biochemical and behavioral profiles of phosphodiesterase inhibition in dopaminergic neurotransmission. *J Pharmacol Sci.* 114 (2010) 6–16.
 19. Nishi A, Kuroiwa M, Miller DB, O'Callaghan JP, Bateup HS, Shuto T, et al. Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum. *J Neurosci.* 28 (2008) 10460–10471.
 20. Sano H, Nagai Y, Miyakawa T, Shigemoto R, Yokoi M. Increased social interaction in mice deficient of the striatal medium spiny neuron-specific phosphodiesterase 10A2. *J Neurochem.* 105 (2008) 546–556.
 21. Siuciak JA, McCarthy SA, Chapin DS, Fujiwara RA, James LC, Williams RD, et al. Genetic deletion of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: evidence for altered striatal function. *Neuropharmacology.* 51 (2006) 374–385.
 22. Siuciak JA, McCarthy SA, Chapin DS, Martin AN, Harms JF, Schmidt CJ. Behavioral characterization of mice deficient in the phosphodiesterase-10A (PDE10A) enzyme on a C57/B16N congenic background. *Neuropharmacology.* 54 (2008) 417–427.
 23. Schmidt CJ, Chapin DS, Cianfrogna J, Corman ML, Hajos M, Harms JF, et al. Preclinical characterization of selective phosphodiesterase 10A inhibitors: a new therapeutic approach to the treatment of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther.* 325 (2008) 681–690.

24. Grauer SM, Pulito VL, Navarra RL, Kelly MP, Kelley C, Graf R, et al. Phosphodiesterase 10A inhibitor activity in preclinical models of the positive, cognitive, and negative symptoms of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther.* 331 (2009) 574–590.
25. Smith SM, Uslaner JM, Cox CD, Huszar SL, Cannon CE, Vardigan JD, et al. The novel phosphodiesterase 10A inhibitor THPP-1 has antipsychotic-like effects in rat and improves cognition in rat and rhesus monkey. *Neuropharmacology.* 64 (2013) 215–223.
26. Suzuki K, Harada A, Shiraishi E, and Kimura H. In vivo pharmacological characterization of TAK-063, a potent and selective phosphodiesterase 10A inhibitor with antipsychotic-like activity in rodents. *J Pharmacol Exp Ther.* 352 (2015) 471–479.
27. Jones PG, Hewitt MC, Campbell JE, Quinton MS, Engel S, Lew R, et al. Pharmacological evaluation of a novel phosphodiesterase 10A inhibitor in models of antipsychotic activity and cognition. *Pharmacol Biochem Behav.* 135 (2015) 46–52.
28. Shiraishi E, Suzuki K, Harada A, Suzuki N, Kimura H. The Phosphodiesterase 10A Selective Inhibitor TAK-063 Improves Cognitive Functions Associated with Schizophrenia in Rodent Models. *J Pharmacol Exp Ther.* 356 (2016) 587–595.
29. Gresack JE, Seymour PA, Schmidt CJ, Risbrough VB. Inhibition of phosphodiesterase 10A has differential effects on dopamine D1 and D2 receptor modulation of sensorimotor gating. *Psychopharmacology (Berl).* 231 (2014) 2189–2197.
30. Megens AA, Hendrickx HM, Mahieu MM, Wellens AL, de Boer P, Vanhoof G. PDE10A inhibitors stimulate or suppress motor behavior dependent on the relative activation state of the direct and indirect striatal output pathways. *Pharmacol Res Perspect.* 2 (2014) e00057.
31. de Lima MN, Presti-Torres J, Dornelles A, Scalco FS, Roesler R, Garcia VA, et al. Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem.* 95 (2011) 305–310.
32. Horiguchi M, Hannaway KE, Adekun AE, Huang M, Jayathilake K, Meltzer HY. D(1) receptor agonists reverse the subchronic phencyclidine (PCP)-induced novel object recognition (NOR) deficit in female rats. *Behav Brain Res.* 238 (2013) 36–43.
33. Rosell DR, Zaluda LC, McClure MM, Perez-Rodriguez MM, Strike KS, Barch DM, et al.

- Effects of the D1 dopamine receptor agonist dihydroxidine (DAR-0100A) on working memory in schizotypal personality disorder. *Neuropsychopharmacology*. 40 (2015) 446–453.
34. Gattaz WF, Schummer B, and Behrens S. Effects of zotepine, haloperidol and clozapine on MK-801-induced stereotypy and locomotion in rats. *J Neural Transm Gen Sect*. 96 (1994) 227–232.
 35. O'Neill MF and Shaw G. Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the dopamine D1 agonist C-APB in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 145 (1999) 237–250.
 36. Kuribara H, Tadokoro S. Correlation between antiavoidance activities of antipsychotic drugs in rats and daily clinical doses. *Pharmacol Biochem Behav*. 14 (1981) 181–192.
 37. Wadenberg ML, Soliman A, VanderSpek SC, Kapur S. Dopamine D(2) receptor occupancy is a common mechanism underlying animal models of antipsychotics and their clinical effects. *Neuropsychopharmacology*. 25 (2001) 633–641.
 38. Natesan S, Vanderspek S, Nobrega JN, McClelland RA, Kapur S. Contrasting loxapine to its isomer isloxapine--the critical role of in vivo D2 blockade in determining atypicality. *Schizophr Res*. 77 (2005) 189–199.
 39. Wadenberg ML and Hicks PB. The conditioned avoidance response test re-evaluated: is it a sensitive test for the detection of potentially atypical antipsychotics? *Neurosci Biobehav Rev*. 23 (1999) 851–862.
 40. Ennaceur A and Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 31 (1988) 47–59.
 41. Nuechterlein KH, Barch DM, Gold JM, Goldberg TE, Green MF, Heaton RK. Identification of separable cognitive factors in schizophrenia. *Schizophr Res*. 72 (2004) 29–39.
 42. Young JW, Powell SB, Risbrough V, Marston HM, Geyer MA. Using the MATRICS to guide development of a preclinical cognitive test battery for research in schizophrenia. *Pharmacol Ther*. 122 (2009) 150–202.
 43. Hotte M, Naudon L, Jay TM. Modulation of recognition and temporal order memory retrieval by dopamine D1 receptor in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 84 (2005) 85–92.

44. Nagai T, Takuma K, Kamei H, Ito Y, Nakamichi N, Ibi D et al. Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex. *Learn Mem.* 14 (2007) 117–125.
45. Clausen B, Schachtman TR, Mark LT, Reinholdt M, Christoffersen GR. Impairments of exploration and memory after systemic or prelimbic D1-receptor antagonism in rats. *Behav Brain Res.* 223 (2011) 241–254.
46. Graybiel AM. The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr Opin Neurobiol.* 15 (2005) 638–644.
47. Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron.* 24 (2010) 896–907.
48. Yawata S, Yamaguchi T, Danjo T, Hikida T, Nakanishi S. Pathway-specific control of reward learning and its flexibility via selective dopamine receptors in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 (2012) 12764–12769.
49. Simpson EH, Kellendonk C, Kandel E. A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuron.* 65 (2010) 585–596.
50. Nikiforuk A, Potasiewicz A, Rafa D, Drescher K, Bepalov A, Popik P. The effects of PDE10 inhibition on attentional set-shifting do not depend on the activation of dopamine D1 receptors. *Behav Pharmacol.* 27 (2016) 331–338.
51. Hoffman DC and Donovan H. Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability. *Psychopharmacology (Berl).* 120 (1995) 128–133.
52. Blanchet PJ, Fang J, Gillespie M, Sabounjian L, Locke KW, Gammans R et al. Effects of the full dopamine D1 receptor agonist dihydroxydine in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol.* 21 (1998) 339–343.
53. Rascol O, Nutt JG, Blin O, Goetz CG, Trugman JM, Soubrouillard C et al. Induction by dopamine D1 receptor agonist ABT-431 of dyskinesia similar to levodopa in patients with Parkinson disease. *Arch Neurol.* 58 (2001) 249–254.

54. Kotera J, Sasaki T, Kobayashi T, Fujishige K, Yamashita Y, and Omori K. Subcellular localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 10A variants, and alteration of the localization by cAMP-dependent protein kinase-dependent phosphorylation. *J Biol Chem.* 279 (2004) 4366–4375.