

中枢神経系疾患治療薬の創製に向けた評価系の構築 と行動薬理学的研究

著者	仲子 友和
発行年	2015-03-23
学位授与機関	関西大学
学位授与番号	34416乙第483号
URL	http://doi.org/10.32286/00000148

論文博士

2015年3月

関西大学審査学位論文

中枢神経系疾患治療薬の創製に向けた
評価系の構築と行動薬理学的研究

仲子 友和

目次

序論.....	3
第1節 はじめに.....	3
第2節 中枢神経系疾患における動物モデル.....	4
(1) 妥当な病態モデルとは.....	4
(2) 統合失調症の陽性症状に関する動物モデル.....	5
(3) 統合失調症の認知機能障害に関する動物モデル.....	7
(4) 自閉症スペクトラム障害に関する動物モデル.....	8
第1章 新規ムスカリン受容体作動薬に関する行動薬理学的研究.....	11
第1節 背景.....	11
(1) 統合失調症治療の現状.....	11
(2) ムスカリン受容体のサブタイプとその特徴.....	11
(3) 統合失調症におけるムスカリン型受容体の関与.....	13
(4) ムスカリン受容体作動薬の探索研究.....	14
(5) Xanomeline を用いた非臨床研究.....	15
(6) ムスカリン受容体作動性に起因する副作用の懸念.....	17
(1) 新規ムスカリン受容体作動薬の作動性.....	18
(2) MAP 試験、および PPI 試験.....	20
(3) 既存薬との併用による MAP 試験、およびカタレプシー誘発試験.....	24
(4) 副作用評価.....	27
(5) 小括.....	30
第2章 コモンマーモセットを用いた認知機能障害モデルの作製.....	31
第1節 背景.....	31
(1) 認知機能障害に関する病態モデルの現状.....	31
(2) NMDA 受容体による認知機能障害の惹起.....	32
(3) コモンマーモセットを用いた認知機能障害モデル.....	33
(4) CANTAB を用いた行動薬理評価.....	34
(5) 陽性対照の選定.....	35
第2節 実験結果および考察.....	37
(1) トレーニング.....	37
(2) Ketamine 用量の設定.....	37
(3) 2 図形課題における ketamine および SKF-81297 の作用.....	37
(4) 3 図形課題における ketamine および SKF-81297 の作用.....	39
(5) 2、および 3 図形課題における ketamine および SKF-81297 の作用のまとめ.....	40

(6) その他の結果と考察.....	40
(7) 作用メカニズムの推定.....	42
(8) 小括.....	42
第3章 コモンマーマセットを用いた自閉症スペクトラム障害モデルの作製、および非定型抗精神病薬 lurasidone の作用検討.....	46
第1節 背景.....	46
(1) 自閉症スペクトラム障害を患った乳幼児に認められる症状.....	46
(2) 自閉症スペクトラム障害病態モデルの現状.....	48
(3) NMDA 受容体機能低下に注目した自閉症スペクトラム障害病態モデルの作製..	49
(4) 陽性対照の選定.....	49
第2節 実験結果および考察.....	51
(1) マーマセットにおける JVA 機能の有無.....	51
(2) Ketamine 誘発 JVA 機能障害に対する lurasidone の作用.....	54
(3) Ketamine は JVA 機能特異的に障害を誘発したか.....	56
(4) その他.....	59
(5) 作用メカニズム.....	60
(6) 小括.....	60
総括.....	61
実験の部.....	62
第1章に関する実験手法.....	62
第2章に関する実験手法.....	66
第3章に関する実験手法.....	69
謝辞.....	74
発表論文目録.....	75
引用文献.....	76

序論

第1節 はじめに

創薬研究では、ヒトにおける薬効を予測するためには動物実験が必要不可欠である。生化学や分子生物学などの基礎研究の発展が基盤となり、20世紀に入り各種疾患に対する治療薬が数多く開発されてきた。これまでに、*in vitro* 試験（試験管などの中で、ヒトや動物などの生物から抽出した組織を用いて生体内と同様の環境を人工的に作り、薬物の作用を調べる手法）や *in silico* 手法（化合物に関するデータベース化した情報を用いてコンピュータ上で仮想実験を行い、実際に対象物を取り扱わず計算で結果を予測する手法）などといった、創薬に関する技術は目覚ましい発展を遂げた一方で、それらの試験のみでヒトにおける薬効を予測することは極めて困難であり、病態モデルを用いた *in vivo* 試験（動物実験）の必要性は変わらぬままである。

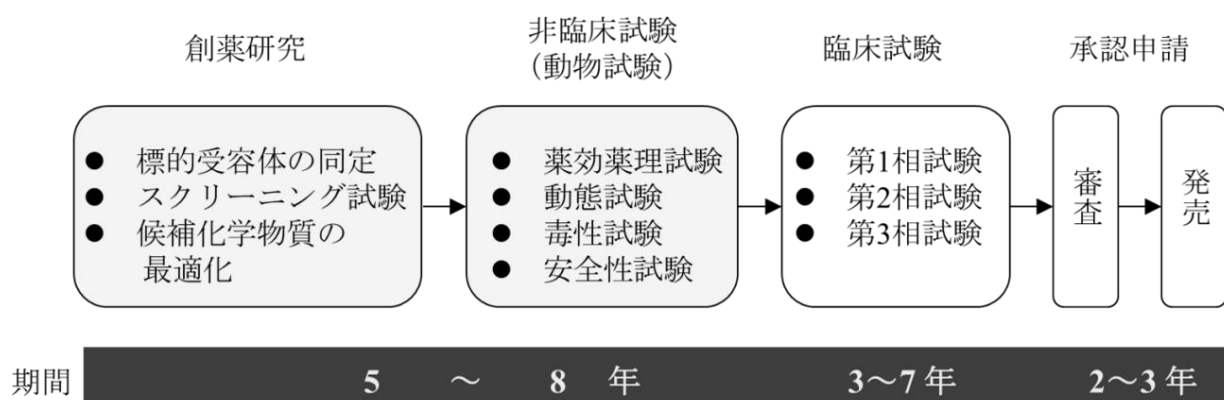


図1 創薬研究のプロセス

第2節 中枢神経系疾患における動物モデル

(1) 妥当な病態モデルとは

新しい治療薬が求められている疾患の一つとして、中枢神経系（CNS）疾患が挙げられる。CNS 疾患はその発症メカニズムが複雑であり、その病態モデル作製には、疾患に関する既知情報を考慮して動物種、試験方法などを適切に設定することが必須である。適切な病態モデルとは、図2に示すような種々の妥当性を併せ持つモデルを指す。一般的に、高血圧症や糖尿病のように血圧や血糖値など容易に数値化できる評価対象がある疾患とは異なり、CNS 疾患は、習性がヒトと大きく異なる動物の行動パターンの変化を治療効果と結びつける必要があるため、図2の全ての妥当性を高い水準で満たす病態モデルの作製は困難である。そのため、より妥当性の高い病態モデルを新たに作製することや、個々のモデルにおける短所を補い合えるよう、複数の試験を組み合わせることで薬効評価を実施することが CNS 疾患治療薬の研究において重要である。

1) 表面妥当性

患者と動物で認められる症状の間に類似性があるか

2) 構成概念妥当性

病態モデルの作製手順が理論的根拠に基づいているか

3) 予測妥当性

動物における化合物の作用が、患者における改善作用を反映しているか

図2 病態モデル作製時に考慮すべき妥当性

(2) 統合失調症の陽性症状に関する動物モデル

統合失調症は CNS 疾患の一つであり、陽性症状、陰性症状、および認知機能障害の主要三症状が存在する (図 3)。これらのうち陽性症状の疾患モデルについて、創薬研究において最も使用されているモデルの一つとして、覚醒剤による自発運動量の亢進を病態の指標にした試験 (覚醒剤誘発運動過多試験) が挙げられる。このモデルは覚醒剤である *methamphetamine* や *amphetamine* といったドパミン作動薬が、ヒトにおいて陽性症状様の行動異常を誘発するという知見に基づいて作製されている。また、既存の抗精神病薬であるドパミン D_2 受容体拮抗薬による薬効が検出可能であるため、本モデルは統合失調症の陽性症状を再現した動物モデルとして、一定の妥当性があると考えられる。しかしながら、 D_2 受容体拮抗作用以外の新規作用機序を有する化合物の効果を評価する上では懸念される点が存在する。まず、本モデルは統合失調症のドパミン仮説に基づいているため、既存薬とは異なる新規作用機序を持つ治療薬候補化合物をスクリーニングする場合には不適切な可能性があり、事実、有効性が検出できない化合物も存在する。次に、本モデルは自発運動量の亢進という、実際の統合失調症患者では観察されない行動異常を指標にしている点である。そのため、例えばプレパルス抑制 (PPI) の異常などといった (図 4)、ヒトでも動物でも共通して認められるような指標を用いた試験も併せて実施することが、新規統合失調症治療薬の候補化合物のスクリーニングに必要であり、ヒトにおける薬効予測精度の向上に繋がると考えられる。

本論文において、著者はムスカリン受容体非選択的作動薬 *xanomeline* の統合失調症治療効果に着目して創薬研究を行った結果、世界初のコンセプトである選択的 M_1/M_4 受容体部分作動薬 **1** (化合物 **1**) と選択的ムスカリン M_4 受容体作動薬 **2** (化合物 **2**) を見出した。第 1 章ではヒトでの統合失調症治療効果の予測、およびコリン性副作用をはじめとする種々の副作用の低減効果の予測を可能にする評価系の構築と、化合物 **1** および **2** を用いて、これまで不明であった、選択的 M_1/M_4 受容体部分作動性および選択的ムスカリン M_4 受容体作動性の効果を反映した種々の行動薬理学的試験の結果について論述する。

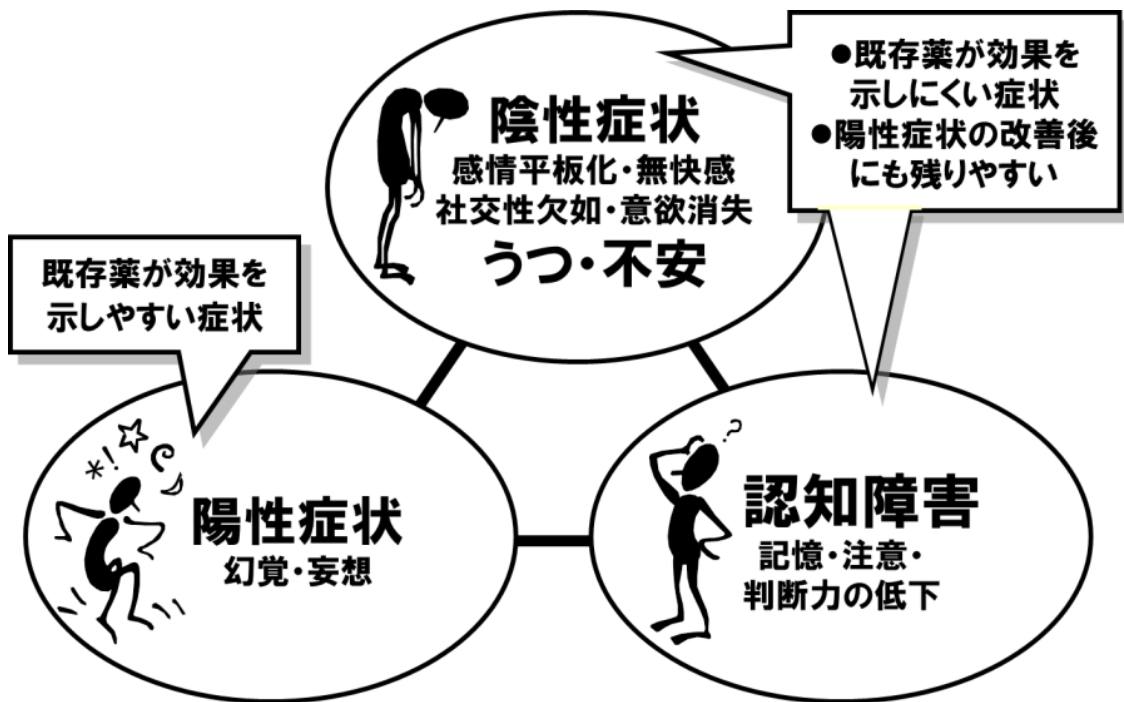


図3 統合失調症の主症状

プレパルス抑制 (Prepulse inhibition; PPI)

- 大きな音刺激に対する驚愕反応が、その直前に弱い音刺激 (プレパルス) を差し挟むことによって抑制される現象。
- 統合失調症患者ではPPIが低下している。

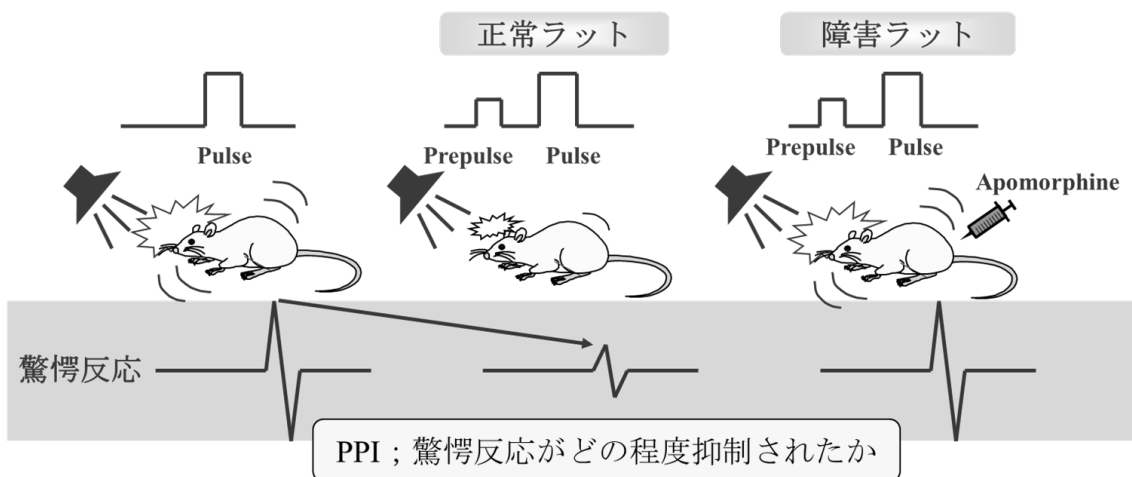


図4 プレパルス抑制

(3) 統合失調症の認知機能障害に関する動物モデル

陽性症状と同じく統合失調症の主症状である認知機能障害では、陽性症状に対する有効性に比べて既存抗精神病薬の効果は臨床で十分とはされていない。事実、これまでに同障害の治療薬として承認された薬剤は存在しない。しかしながら、臨床現場における実情に反して、げっ歯類を用いた認知機能障害モデルでは既存薬が薬効を示すことが報告されており、げっ歯類とヒトとの間で既存薬の反応性に種差が認められる。このような相違の原因として、認知機能に関与する脳部位である前頭前皮質(PFC)がげっ歯類ではヒトと比較して未発達であることや、非臨床試験に用いられる試験手順が実際にヒトで用いられる評価方法と異なることなどが考えられるため、PFCの発達度合に関する相違という問題を克服すべく、PFCがげっ歯類と比較して発達している動物種である非ヒト霊長類(NHP)を用いてヒトに近い病態モデルを構築する試みが行われてきた。これまでのNHPを用いた非臨床試験では、一般的にアカゲザルやカニクイザルといった大型のサルが用いられてきたが、体格が大きいため取り扱いが困難であり、かつ多くの被験物質量が必要であるため、化合物のスクリーニング段階での使用には不向きであるなどの問題点があった。小型であるにも関わらずげっ歯類と比較してPFCが発達しており、さらにげっ歯類では実施できないような複雑な操作を行えるNHPである、コモンマーモセット（以下、マーモセットとする、図5）が近年実験動物として注目されている。しかしながら、マーモセットを用いた認知機能障害モデルに関する報告はこれまでになされておらず、同モデルの作製が望まれていた。



図5 コモンマーモセット

本研究では、げっ歯類のモデルと比較して妥当性のある認知機能障害モデルを作製することを目的として、

- ① PFC の発達認められるマーマセットの使用
- ② 臨床試験でも用いられており、タッチパネルを使用することを特長とする認知機能評価法である CANTAB の使用
- ③ 健常人において統合失調症様の認知機能障害を惹起する薬剤である NMDA 受容体阻害薬 ketamine による障害誘発
- ④ 認知機能障害改善作用を有する可能性が示唆されている化合物であるドパミン D₁ 受容体作動薬 SKF-81297 による改善作用

を特徴とするモデルの構築および検証を行った。第2章では、詳細な経緯および試験の結果、ならびにマーマセットの認知機能障害に関する行動薬理学的研究について論述する。

(4) 自閉症スペクトラム障害に関する動物モデル

自閉症スペクトラム障害(ASD)は発達障害の一種であり、社会的相互性の障害、および反復的・限定的な関心・行動といった中核症状と、注意機能障害や多動などを始めとする周辺症状とからなる。米国精神医学会により発表された、精神疾患の診断分類である DSM-IVにおいて、ASD は患者の知能や重症度に応じて図6のように分類されていたが、2013年に発表された DSM-5 への改訂により、自閉症や広汎性発達障害、アスペルガー症候群といった分類は廃止され、ASD へと統合された。前述の統合失調症の認知機能障害と同様、これまでに ASD の中核症状に有効な薬剤は創出されておらず、その原因の一つとして、臨床予測確度が高い動物モデルが確立されていないことが挙げられる。これまでの ASD 治療薬の創薬研究では主にげっ歯類を用いた社会的相互性障害モデルが使用されているが、そもそもげっ歯類では、ASD を患っている幼児(ASD 児)特有の行動である、他者の指差しや視線に反応できないといった複雑な行動を再現することができず、ヒトの病態を正確に反映したモデルとは言えない。また、ASD においても PFC の異常が発症に関与していると考えられており、ASD の病態モデル作製においても、NHP を用いることがヒトにおける病態を反映するモデルの構築に繋がると期待できる。

本論文の第3章では、ASD児は相手の指差しに反応する機能、すなわち共同注視(JVA)機能が低下していることに着目し、妥当性のある病態モデルを作製することを目的としてマーモセットを用いたモデル構築研究を行った。これまでにマーモセットがJVA機能を有しているか検証を行った報告はなされていないことから、まずマーモセットのJVA機能を簡便に測定するための装置を作製し、本装置を用いて、

- ① マーモセットにおけるJVA機能の有無
- ② 統合失調症と同様にASD発症に寄与するとされていると考えられるNMDA受容体機能低下を誘発するketamineが、JVA機能障害を誘発するか
- ③ ラット皮質部においてグルタミン酸遊離を亢進させることが報告されている抗精神病薬lurasidoneが、ketamine誘発JVA機能障害を改善するか
- ④ Ketamineは注意機能の障害や健忘を惹起するのではなく、JVA機能を特異的に障害するか

について検証した。これらの経緯や試験結果について第3章において論述する。

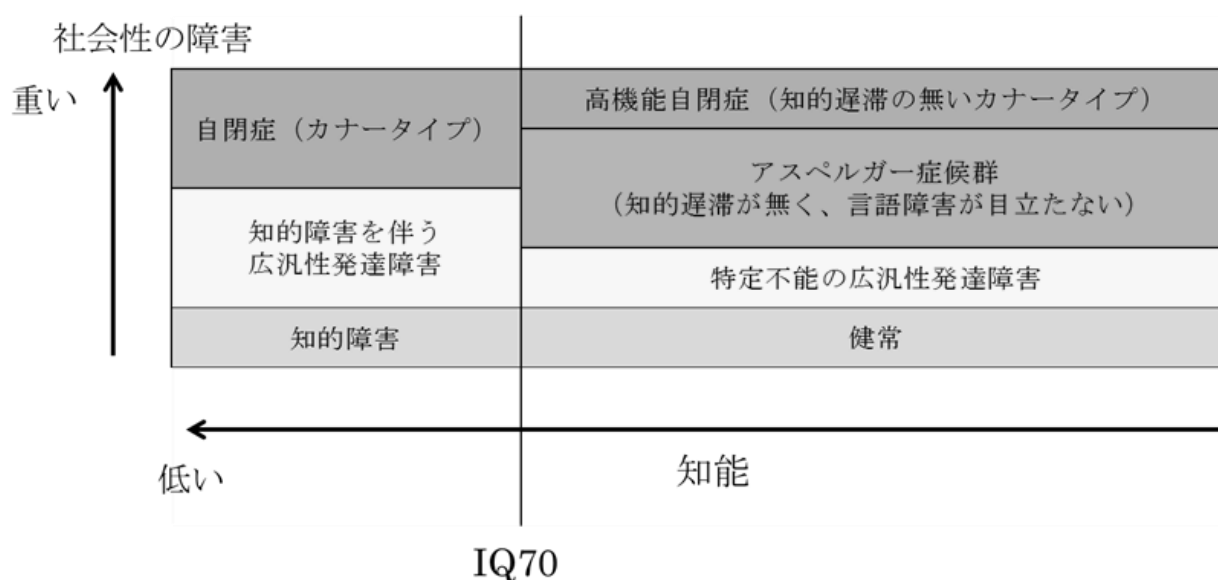


図6 DSM-IVにおけるASDの分類に関する概略図

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ACh: acetylcholine

ASD: autism spectrum disorder

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

CANTAB: cambridge neuropsychological test automated battery

CNS: central nervous system

CTZ: chemoreceptor trigger zone

EC₅₀: half maximal effective concentration

E_{max}: maximum efficacy

FDA: Food and Drug Administration

GABA: gamma-aminobutyric acid

IJA: initiating joint attention

JVA: joint visual attention

KO: knockout

MAP: methamphetamine

NHP: non-human primate

NMDA: *N*-methyl-D-aspartic acid

PCP: phencyclidine

PFC: prefrontal cortex

PKA: protein kinase A

PLC: phospholipase C

PPI: prepulse inhibition

RJA: responding to joint attention

SPECT: single-photon emission computerized tomography

SWM: spatial working memory

第1章 新規ムスカリン受容体作動薬に関する 行動薬理学的研究

第1節 背景

(1) 統合失調症治療の現状

統合失調症は、幻覚や妄想といった陽性症状、感情平板化や社交性欠如、意欲消失といった陰性症状、および記憶、注意、判断力の低下といった認知機能障害を主症状とする精神疾患である(図3) [1, 2]。これまでに多くの治療薬が開発されてきたが、その既存薬はドパミン D_2 受容体拮抗作用によって、特に陽性症状に対して改善作用を示すことが知られている。しかしながら、 D_2 受容体拮抗作用に起因する錐体外路症状を始めとした副作用の発現により用量が制限されることがある[3]、そもそも D_2 受容体拮抗薬に反応しない治療抵抗性患者が存在する[4]などの問題があるため、新規作用機序を有する統合失調症治療薬の研究開発が求められている。

(2) ムスカリン受容体のサブタイプとその特徴

生体内の神経伝達物質の一つとして acetylcholine (ACh) があり、この ACh が作用する受容体として、ニコチン、およびムスカリン受容体が存在する(図7)。このうちムスカリン受容体は、ACh による生体内の多くの重要な生理反応に関与している。G タンパク質共役型受容体ファミリーの一つであるムスカリン受容体は、その機能や発現部位によって M_1 から M_5 までのサブタイプに分類できる(図8) [5-8]。これまでに M_1 、 M_3 、および M_5 受容体は $Gq/11$ 型 G タンパク質を介したホスホリパーゼ C の活性化により、また M_2 、 M_4 受容体は Gi/o 型 G タンパク質を介したアデニル酸シクラーゼの抑制や K^+ チャンネルの開口により、それぞれシグナル情報伝達を制御していることが明らかになっている。また各サブタイプの発現部位は異なっており、 M_1 、 M_4 、および M_5 受容体は主に中枢神経系に発現しているのに対して、 M_2 、 M_3 受容体は中枢神経系と末梢神経系どちらにおいても発現している[7, 9]。

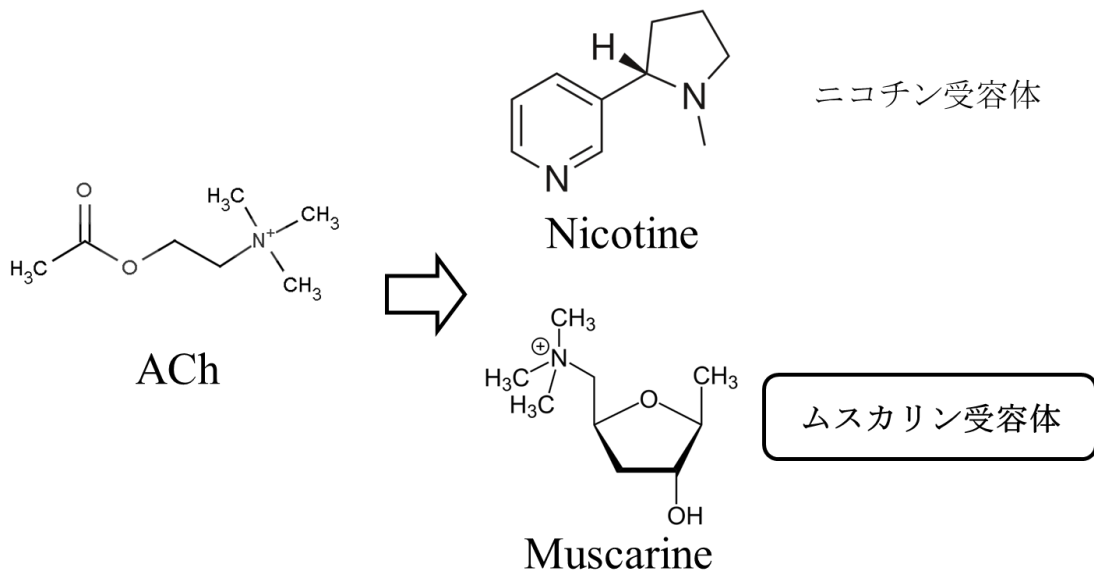


図7 AChの構造とAChが作用する受容体、およびそれらのリガンド

受容体		機能	サブタイプ	分布
ムスカリン受容体	G _{q/11} 結合型	PLC活性化	M ₁	脳全般、神経節
			M ₃	腺組織、平滑筋
			M ₅	血管内皮、脳の一部(黒質等)
	G _{i/o} 結合型	アデニル酸シクラーゼ抑制 Ca ²⁺ チャンネル開口抑制 K ⁺ チャンネル開口	M ₂	脳(特に小脳)、心臓、平滑筋
			M ₄	脳(特に線条体)

図8 ACh受容体の機能と発現部位

(3) 統合失調症におけるムスカリン型受容体の関与

放射線などを用いる脳画像研究により、統合失調症患者の脳内ではムスカリン受容体の機能異常をきたしていることが示唆されている[10]。ムスカリン受容体非選択的リガンドである ^{123}I -I-QNBを用いた単一光子放射断層撮影(SPECT)により、健常人と比較して未治療患者では皮質や基底核におけるムスカリン受容体結合能の低下が認められ、さらにこの結合能の低下と陽性症状における重症度の間には相関が認められた。また、死後脳の研究において、 M_1 および M_4 受容体に比較的選択的なりガンドである ^3H -pirenzepineの結合能は、統合失調症患者の前頭前皮質(PFC)、および海馬において低下していた[11-13]。また、患者のPFCおよび海馬において、それぞれ M_1 および M_4 受容体の mRNA 発現量の低下が認められた[12, 14]。

M_1 から M_5 受容体ノックアウト(KO)マウスを用いた研究により、統合失調症における各サブタイプの役割に関する重要な情報がもたらされた[9]。ムスカリン受容体非選択的拮抗薬である scopolamine により認知機能の複数のドメインにおいて障害が認められることが知られているが[15]、 M_1 受容体 KO マウスでは、モリス水迷路試験や恐怖条件付け文脈学習試験における学習や記憶に有意な障害は認められなかった[16, 17]。しかしながら、作業記憶や win-shift 課題といった皮質と海馬の間で情報伝達の相互作用が必要とされる課題では障害が認められ[17]、また 5 肢選択反応時間課題においては固執行動が認められた[18]。作業記憶障害や固執行動は統合失調症患者においても認められることから[19, 20]、統合失調症の認知機能障害の一部については、 M_1 受容体機能低下に起因している可能性が考えられる。また、 M_1 受容体 KO マウスでは、線条体におけるドパミン遊離量の増加を伴う自発運動量の亢進や[16, 21]、amphetamine 誘発運動過多の増強が認められたことを考慮すると[21]、 M_1 受容体機能低下は認知機能障害のみならず、陽性症状にも関与していることが示唆される。一方で、同じく脳内で多く発現しているサブタイプである M_4 受容体の KO マウスにおいても、 M_1 受容体と同様に自発運動量の亢進が認められた[22, 23]。Tzavara らは、 M_4 受容体は中脳に投射するコリン作動性神経に自己受容体として発現し、KO マウスの中脳において ACh 量が上昇していることを報告した[24]。さらに、amphetamine によるドパミン遊離の亢進は M_4 受容体 KO マウスにおいて増強されることが報告されており、これらの知見から、 M_4 受容体機能低下は統合失調症における陽性症状に寄与していることが示唆される。以上のことをまとめると、統合失調

症において M_1 受容体は認知機能障害と陽性症状に、 M_4 受容体は陽性症状にそれぞれ寄与していることが示唆され、 M_1/M_4 両受容体を賦活化する化合物が新たな統合失調症治療薬として有用である可能性が考えられる。

(4) ムスカリン受容体作動薬の探索研究

ここ 20 年の間に、 M_1 、 M_4 受容体の両方、またはいずれか一方を賦活化する化合物創製の試みがなされてきたが[25, 26]、統合失調症を適応として承認されたものは存在しない。その原因としては、安全性における懸念や、薬効と副作用の間で十分な安全域が確保できなかったことなどが考えられる。これまでに開発されたムスカリン受容体作動薬の一つである xanomeline (図 9) は、アルツハイマー病患者を対象にした大規模二重盲検試験において非常に優れた薬効を示し、認知機能や行動症状を改善した[27]。しかしながら用量依存的に嘔吐や流涎、下痢といった消化器系副作用を誘発し、これらが直接の原因であるかは明らかではないものの、それ以降の開発は中止された。一方で、xanomeline は統合失調症治療薬としての開発もなされており、陽性症状、陰性症状、および認知機能障害の全ての症状を改善したことから[28, 29]、この結果は M_1/M_4 受容体賦活化が統合失調症治療において有効であるという proof of concept の取得へと繋がった。また、本臨床試験に参加した患者は、既存の D_2 受容体拮抗薬による治療効果が不良である治療抵抗性患者であったことから、 M_1/M_4 受容体賦活化は、既存薬に治療抵抗性を示す患者に対する有用なアプローチであることも示唆された。

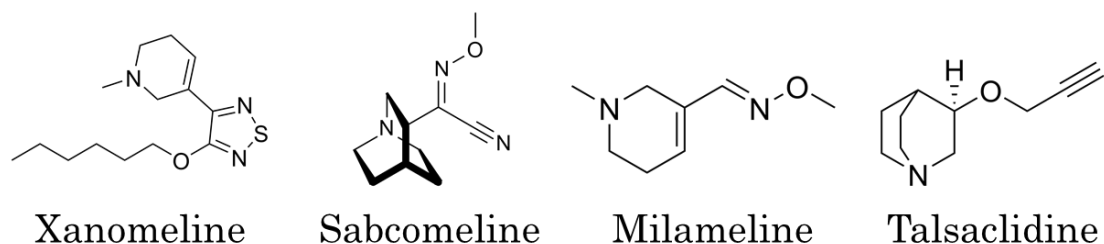


図9 これまでに開発されたムスカリン受容体作動薬の一例

(5) Xanomeline を用いた非臨床研究

M_1/M_4 受容体作動薬に関する臨床試験における報告は限られているが、非臨床試験については多くの報告がなされている。臨床試験において抗精神病作用が認められたことと一致して、xanomeline は複数のげっ歯類モデルにおいて強力な抗精神病様作用を示しており、 D_1/D_2 受容体作動薬 apomorphine 誘発クライミング行動やプレパルス抑制 (PPI) 障害、および amphetamine 誘発運動過多を抑制、または改善した [30-32]。このような xanomeline による抗精神病様作用は sabcomeline、milameline、talsaclidine (図9) などといった他のムスカリン受容体作動薬においても認められていることから [27]、xanomeline による統合失調症患者に対する治療効果はムスカリン受容体の賦活化に基づくと考えられる。さらに、xanomeline と M_1 または M_4 受容体 KO マウスとを用いた薬理学研究によって、ムスカリン受容体各サブタイプが抗精神病作用に寄与する機構が明らかになってきた。Wooley らは amphetamine 誘発運動過多に対する xanomeline の改善作用が、 M_4 受容体 KO マウスにおいてはほぼ完全に消失し、 M_1 受容体 KO マウスでは部分的な抑制に留まることを報告している [33]。また Dencker らは、線条体における D_1 受容体発現細胞に発現している M_4 受容体を選択的に欠損したマウスでも、xanomeline による抗精神病様作用が消失したことを明らかにしている [34]。線条体において、 M_4 受容体の活性化は直接路にてドパミン D_1 受容体シグナルに拮抗し、long-term depression をもたらすことが報告されるなど (図10)、特に M_4 受容体は注目を集めているが、その選択的作動薬が報告されていないため、サブタイプ選択的 M_4 受容体作動薬の創製およびその行動薬理学的研究が望まれていた。

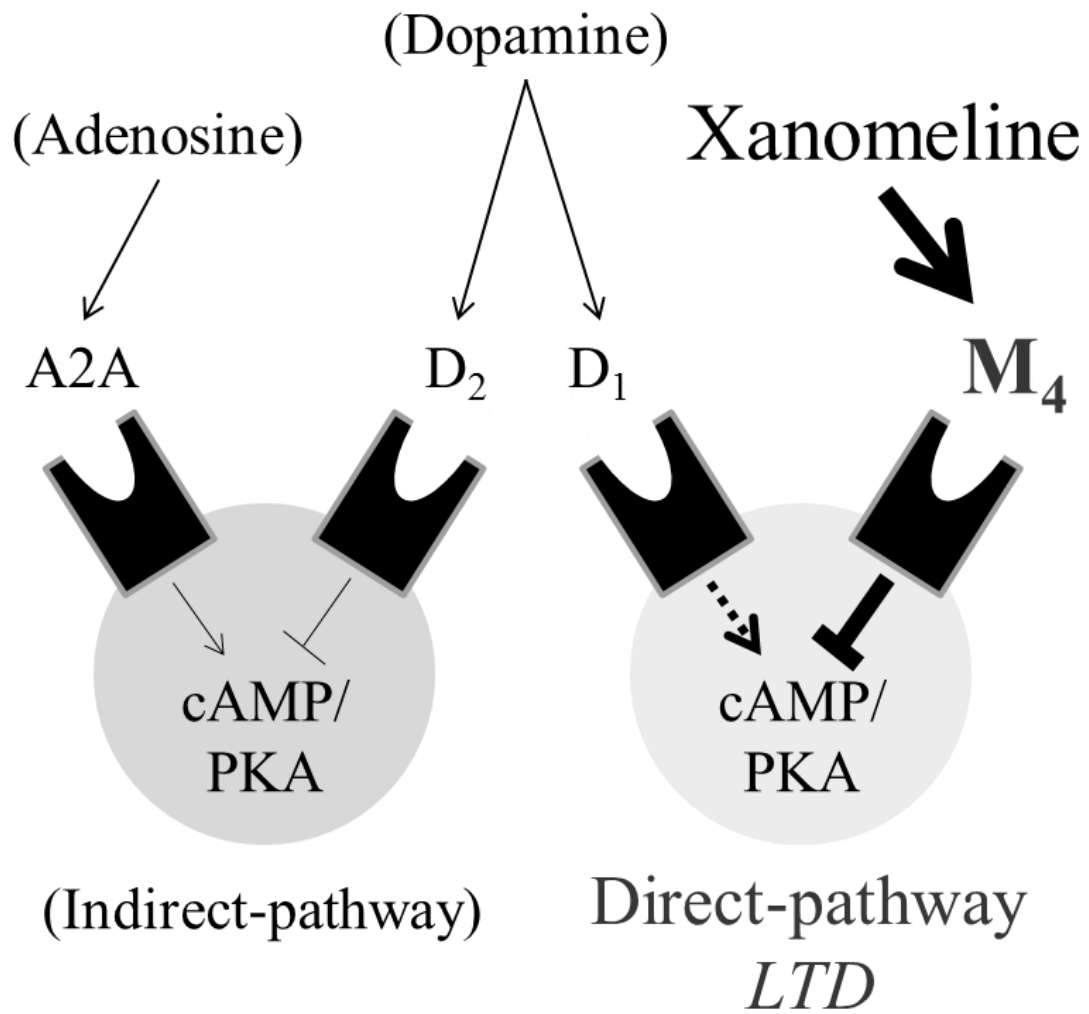


図 10 Xanomeline の統合失調症における作用メカニズムに関する概略図

(6) ムスカリン受容体作動性に起因する副作用の懸念

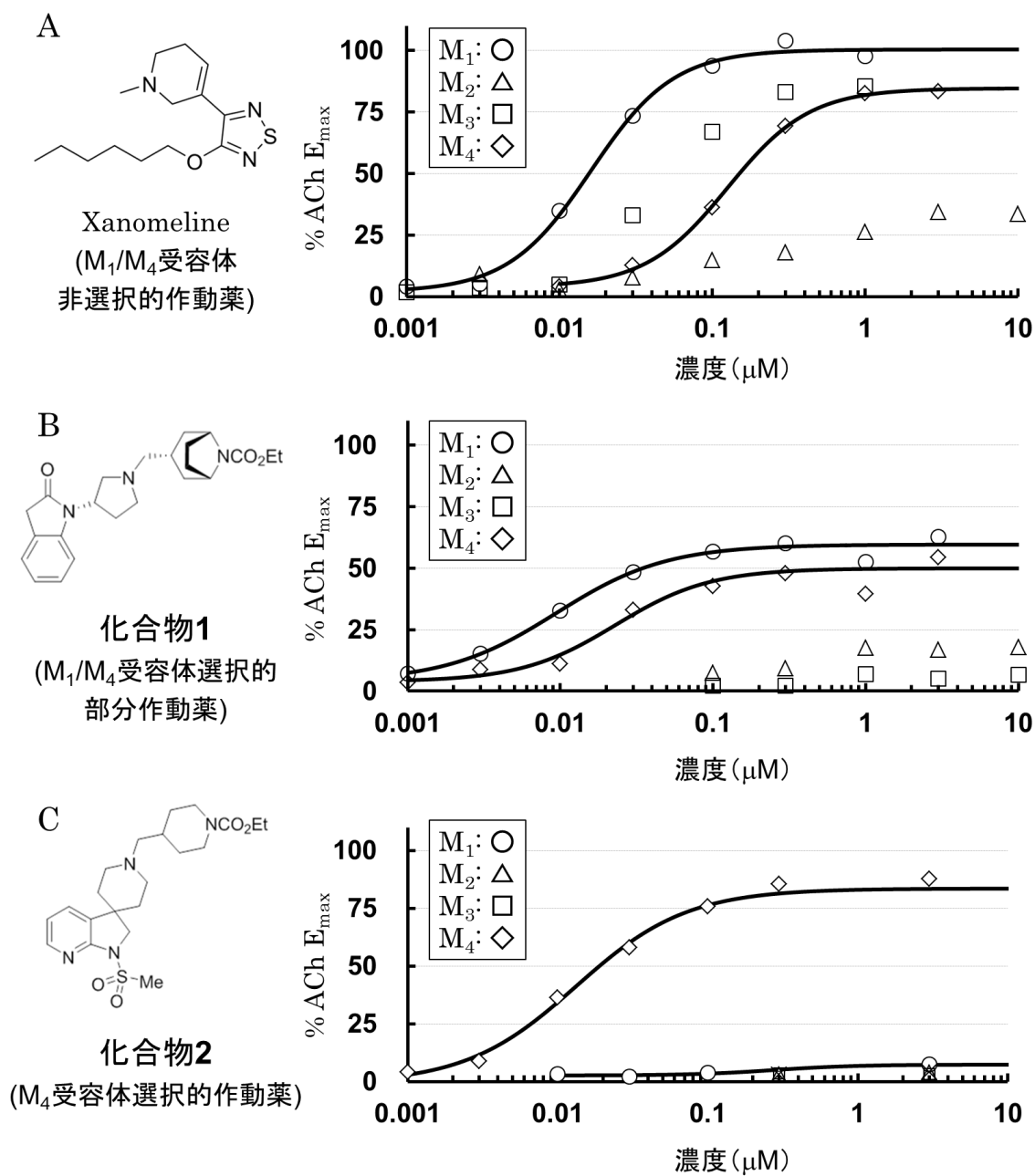
ここまでで、 M_1 受容体は認知機能障害および陽性症状へ、 M_4 受容体は陽性症状への関与がそれぞれ示唆されていることを論述した。一方でこれらの受容体を介した副作用も懸念される。延髄には、嘔吐反射を発生させる領域である嘔吐中枢が存在し、さらにその近傍には化学受容器引き金帯 (CTZ) が存在する。 M_1 受容体は CTZ にも発現しており、受容体が賦活化すると嘔吐中枢へ興奮が伝わり嘔吐が誘発される[35]。実際、強力な M_1 作動性を示す xanomeline は臨床試験に参加したアルツハイマー病患者のうち約 40%において嘔吐を誘発した[27]。一方で、KO マウスを用いた研究において、非選択的ムスカリン受容体作動薬である pilocarpine が誘発する痙攣および致死は、野生型および M_2 - M_5 受容体 KO マウスにおいては認められたものの、 M_1 受容体 KO マウスでは消失した[36]。以上のことから、 M_1 受容体は嘔吐や痙攣を誘発する可能性が考えられる。また M_4 受容体 KO マウスを用いた研究において、既存薬により惹起されるカタレプシーが KO マウスでは減弱することが報告されている[37]。カタレプシーはヒトにおける錐体外路症状のモデルと考えられており、この結果から M_4 受容体作動性を有する化合物と既存薬を併用すると、既存薬による錐体外路症状が増悪化する可能性が考えられる。また、 M_2 / M_3 受容体賦活化により種々の副作用が発現する可能性も懸念される。KO マウスを用いた研究において、oxotremorine 誘発振戦は、 M_2 受容体 KO マウスにおいてのみ消失したことから[36]、本受容体に対する結合親和性は乖離する必要がある。さらに M_3 受容体は、その賦活化により流涎といった腺分泌亢進や縮瞳を誘発する可能性が考えられる[36]。

以上のことから、著者は M_1 / M_4 受容体選択的で M_2 / M_3 受容体作動性を乖離しており、かつ M_1 / M_4 受容体への作動性が xanomeline と比較して部分的な化合物が創製できれば、それは統合失調症の症状に薬効を示しつつ、ムスカリン受容体に起因する副作用を乖離することが可能な画期的な新規治療薬となるのではないかと考えた。このような化合物を取得するため構造活性相関研究を行った結果、 M_1 / M_4 受容体選択的部分作動薬 **1** (化合物 **1**、図 11B) と M_4 受容体選択的作動薬 **2** (化合物 **2**、図 11C) を見出した。これらはいずれも過去に報告されたことの無いコンセプトである。そこで著者は、これらの化合物の単独での作用、または既存薬との併用による作用を検証するため各種行動薬理試験を実施した。

第2節 実験結果および考察

(1) 新規ムスカリン受容体作動薬の作動性

ムスカリン受容体非選択的作動薬である xanomeline に関する知見に基づき、 M_1/M_4 受容体選択的で、その作動性が部分的な化合物を探索した結果、ムスカリン受容体発現細胞を用いた作動性評価により、図 11、および表 1 に示されるような構造、および活性を有する M_1/M_4 受容体選択的部分作動薬である化合物 **1**、および M_4 受容体選択的作動薬である化合物 **2** を見出した。



ACh による最大反応を 100% (E_{max}) とした。

図 11 Xanomeline、化合物 1、および化合物 2 の構造式、および作動性

	EC ₅₀ (nM) / E _{max} (%), または作動性				
	M ₄	M ₁	M ₂	M ₃	M ₅
Xanomeline	126 / 85	16 / 100	379 / 36	44 / 86	46% (30 μM)
化合物1	23 / 50	9 / 60	13% (30 μM)	4% (30 μM)	4% (10 μM)
化合物2	13 / 84	7% (3 μM)	4% (30 μM)	4% (30 μM)	6% (30 μM)

表 1 各化合物の EC₅₀、および E_{max}

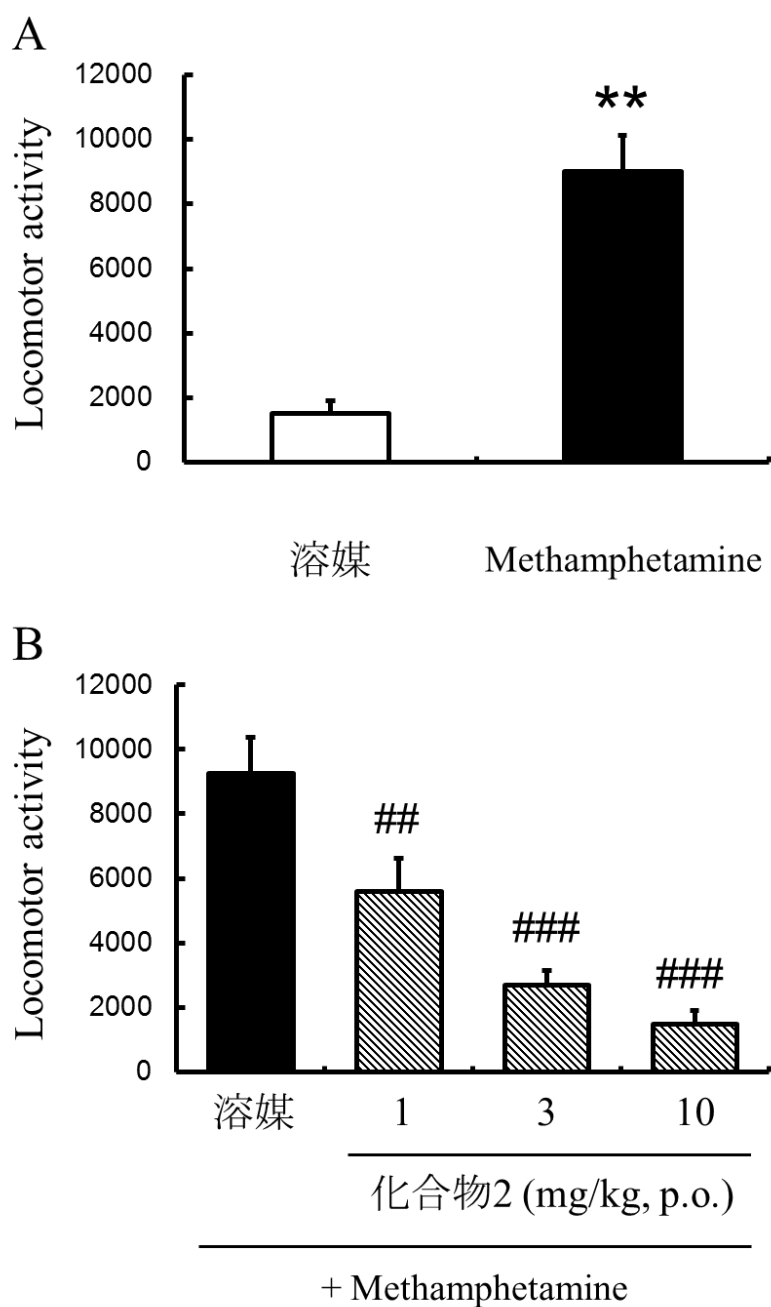
(2) MAP 試験、および PPI 試験

抗精神病様作用評価法として、ラットを用いた methamphetamine 誘発運動過多試験 (MAP 試験)、およびプレパルス抑制試験 (PPI 試験) を実施した。methamphetamine 投与により自発運動量は有意に亢進した (図 12A)。なお、以降の試験においては動物使用数削減の観点から、methamphetamine を投与しない溶媒対照群を設定しなかった。

次に、M₄ 受容体選択的作動薬である化合物 2 の作用を評価した。その結果、用量依存的かつ有意な抗精神病様作用が認められた。本結果により、著者は M₄ 受容体選択的作動薬が抗精神病様作用を示すことを初めて明らかにした (図 12B)。

続いて xanomeline (図 12C)、および化合物 1 (図 12D) の評価を実施した結果、いずれの化合物も methamphetamine による運動量亢進を用量依存的、かつ有意に抑制したことから、これまでの報告と同様に xanomeline の作用を検出できたと同時に、陽性症状の改善に寄与すると考えられる M₁/M₄ 受容体作動性が部分的であっても、薬効は保持されることが明らかになった。既存薬の陽性症状におけるヒトでの薬効用量と、この MAP 試験における有効用量との間で相関があることから、本試験はヒトでの薬効を予測する上で妥当性の高い病態モデルであると考えられる。一方で、本モデルは自発運動量の亢進という統合失調症患者では認められない行動異常を指標にしていることから、表面妥当性が乏しいと考えられる。そこで、ヒトでも動物でも共通して認められる PPI を指標に用いた試験を併せて実施し、ヒトで再現可能な行動変化に対する効果を検証した。

まず、ドパミン D₁/D₂ 受容体作動薬である apomorphine により有意な PPI の低下が認められた。一方で、ヒトで統合失調症の治療効果を示した xanomeline はこれまでの報告と同様に[32]、apomorphine 誘発 PPI 低下を有意に改善した (図 13A)。次に、化合物 1 を投与したところ、xanomeline と同様に PPI 低下を改善したことから (図 13B)、化合物 1 は表面妥当性を有する試験においても xanomeline と同様に抗精神病様作用を示した。また、本試験により著者らは M₁/M₄ 受容体部分作動性により PPI 障害が改善されることを初めて明らかにした。



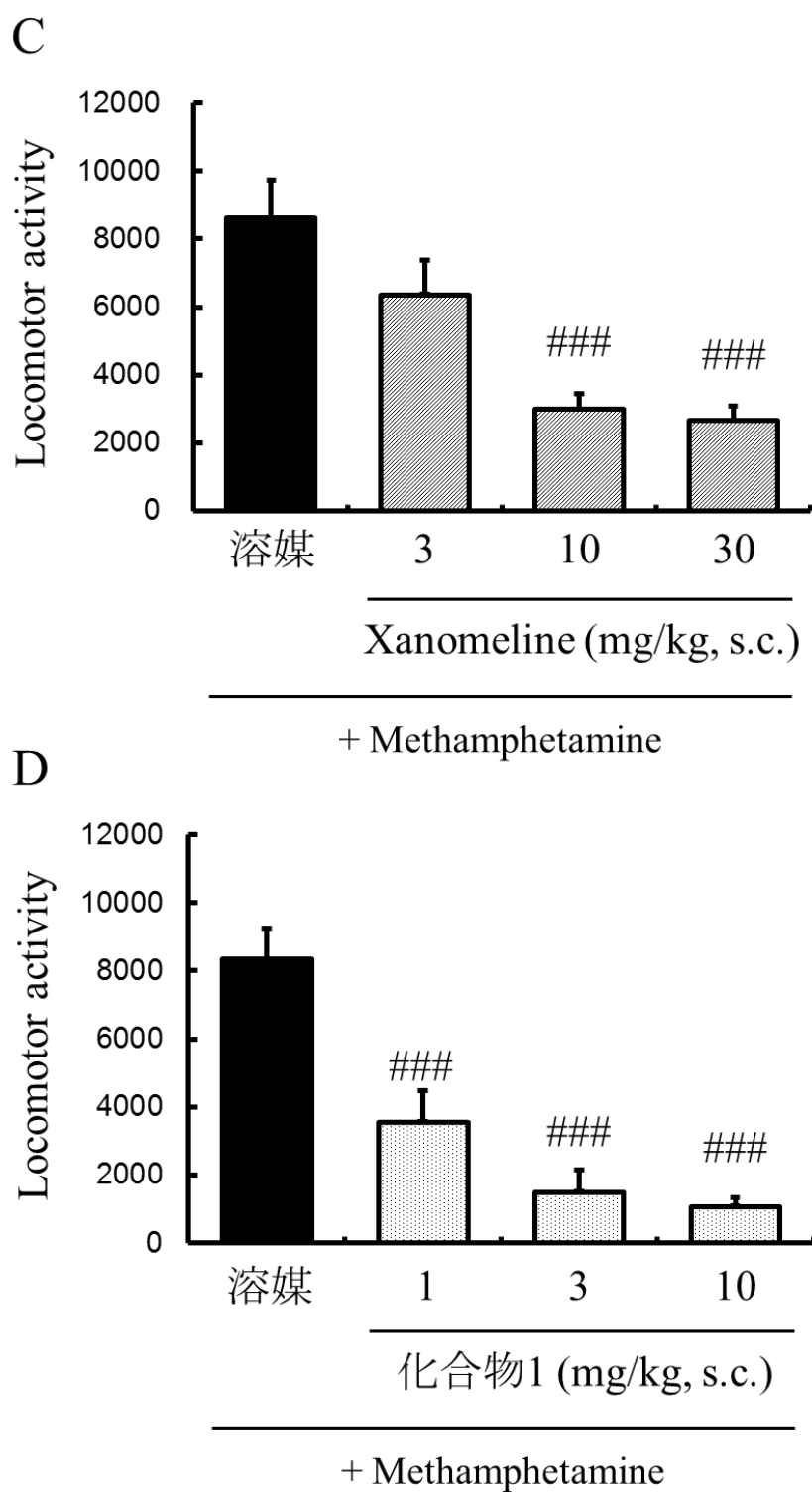


図 12 (A) Methamphetamine がラットの自発運動量に及ぼす作用(n = 6)。** $P < 0.01$ (unpaired t test). (B-D) 化合物 2、xanomeline、および化合物 1 の methamphetamine 誘発運動過多への作用(n = 6)。## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ (Dunnett test).

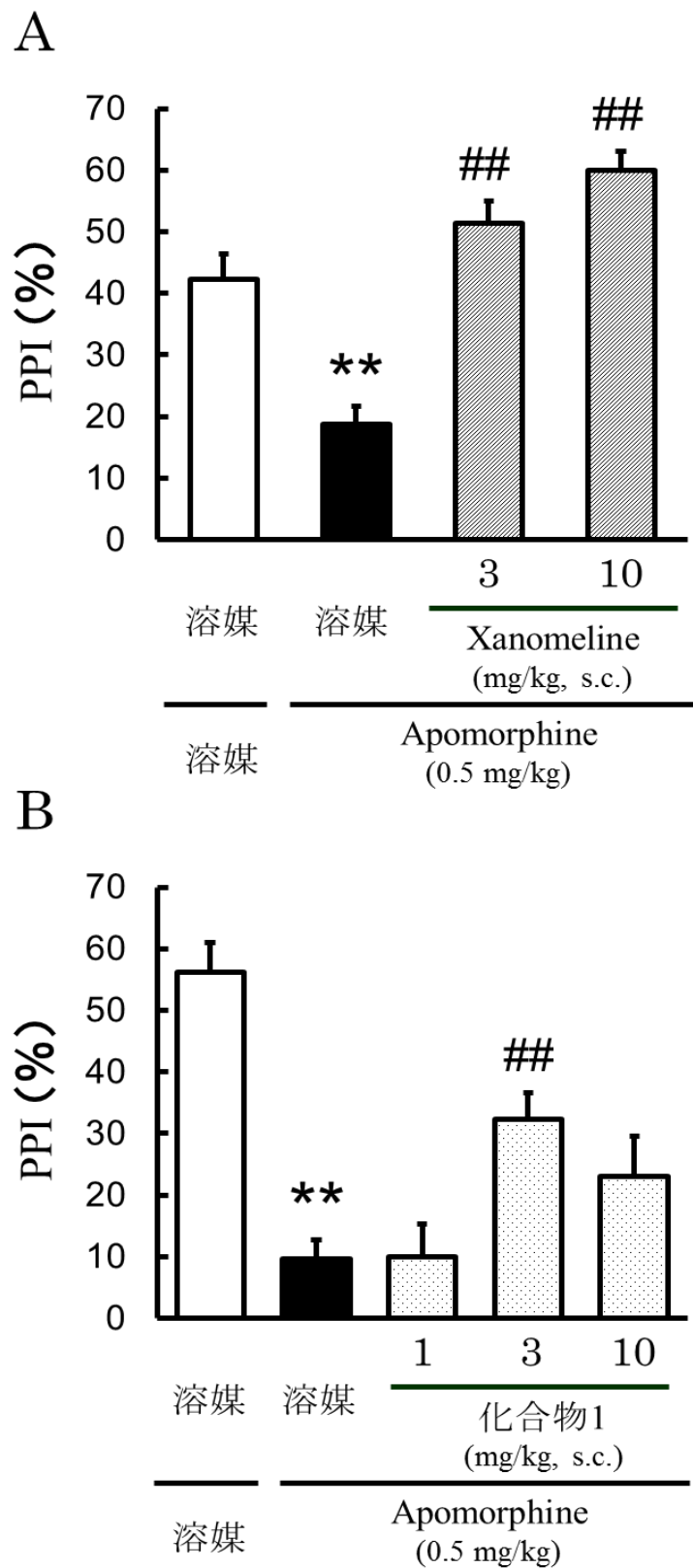


図 13 Apomorphine 誘発 PPI 障害に対する xanomeline(A)、および化合物 1(B) の作用(n = 7-9)。** $P < 0.01$ (unpaired t test), ## $P < 0.01$ (Dunnett test).

(3) 既存薬との併用による MAP 試験、およびカタレプシー誘発試験

先述のように、M₄受容体の KO マウスでは D₂受容体拮抗薬によるカタレプシーが減弱した。M₄受容体の作動性を部分的にした目的の一つは、現在臨床で用いられている抗精神病薬との併用により錐体外路症状が増悪しないことを期待した点である。本コンセプトを検証すべく、化合物 1 と統合失調症治療に頻用される抗精神病薬である risperidone との併用試験を行った。MAP 試験において、ともに有意な抗精神病様作用を示さない用量の化合物 1 (0.6 mg/kg, s.c.)と risperidone (0.6 mg/kg, p.o.)を併用したところ、有意な抗精神病様作用が認められ、抗精神病薬との併用により相乗効果が期待できることを明らかにした (図 14)。

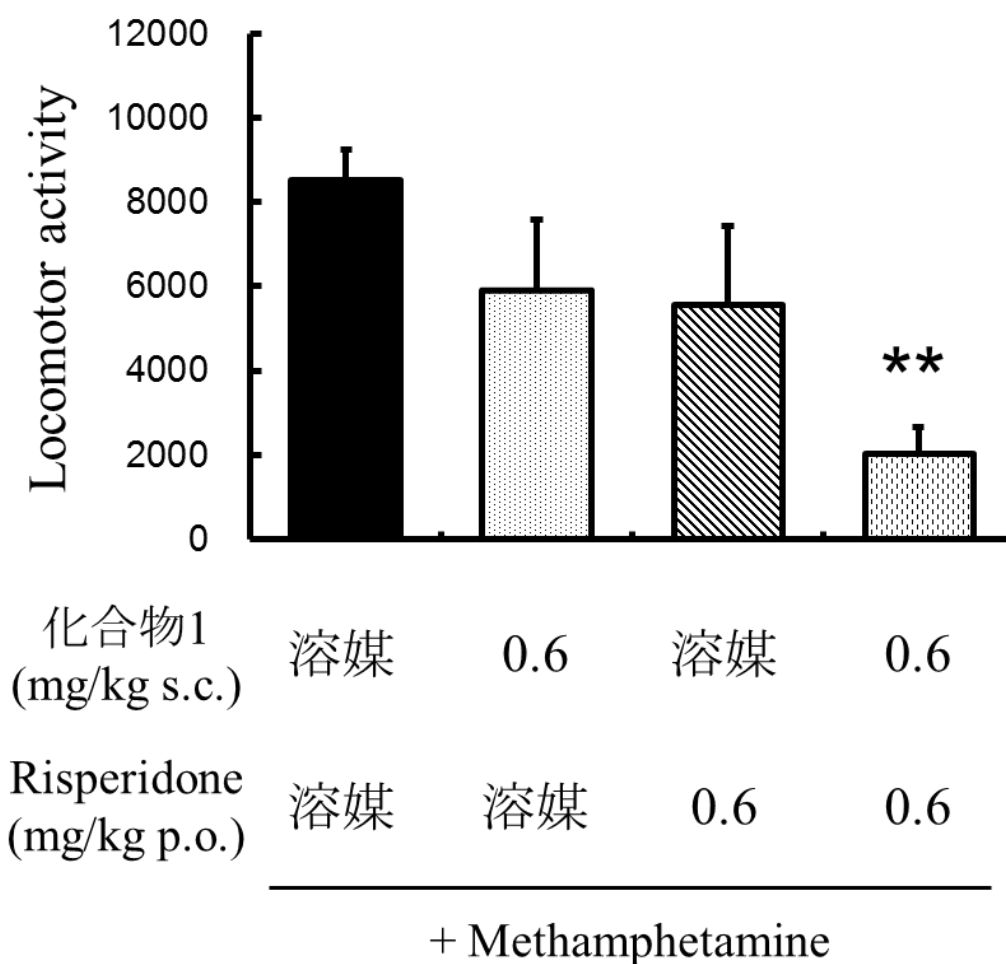


図 14 Methamphetamine 誘発運動過多における、無効量の risperidone に対する化合物 1 の併用効果(n = 6)。** $P < 0.01$ (Dunnett test).

一方で、 M_4 受容体作動性を有する化合物と既存薬を併用すると、ヒトにおいて錐体外路症状が増悪化する可能性が考えられる。そこで、xanomeline や化合物 **1** が、既存薬である haloperidol や risperidone が誘発するカタレプシーを増悪化するかについて、ラットを用いた実験で検証した。その結果、xanomeline (図 15A)、および化合物 **1** (図 15B) は単独ではカタレプシーを惹起しなかった。一方で、既存薬により惹起されたカタレプシーについて、 M_4 作動性の強い xanomeline は有意な増悪化作用を示したが、 M_4 作動性が比較的弱い化合物 **1** は増悪化作用を示さなかった。本結果から著者らは、臨床試験では明らかでなかった xanomeline と既存薬との併用により錐体外路症状が悪化する可能性を見出し、また M_4 受容体の作動性を部分的にすることで薬効の相乗作用を保持しつつ、錐体外路症状悪化リスクを回避できることを見出した。以上の結果から、錐体外路症状の発現により既存薬を増量できない患者において、化合物 **1** は既存薬と併用する新たな治療選択肢を提供することが期待できる。

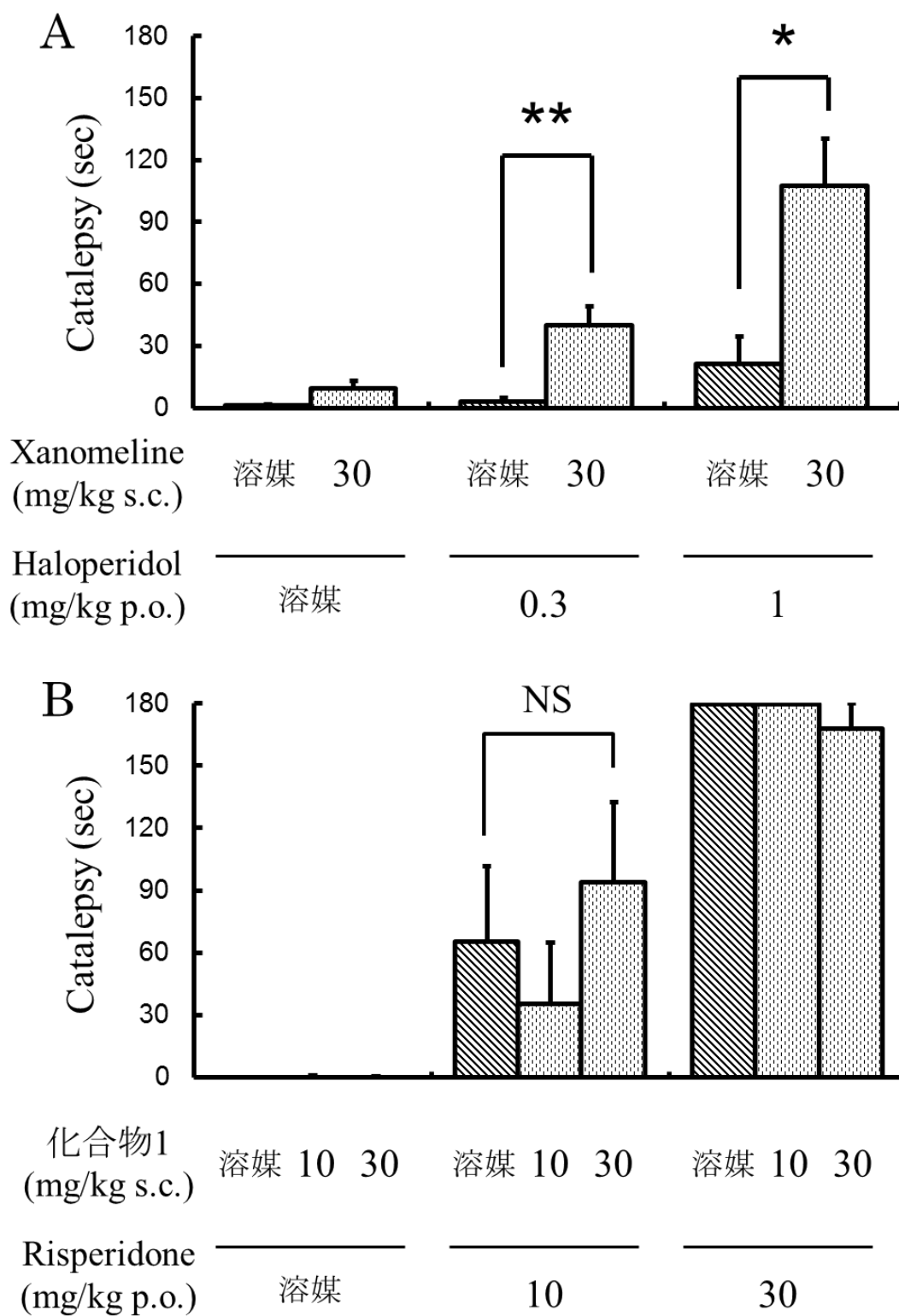


図 15 (A) Haloperidol 誘発カタレプシーに対する xanomeline の作用(n = 6)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Dunnett test). (B) Risperidone 誘発カタレプシーに対する化合物 1 の作用(n = 6)。NS, not significant. (Dunnett test).

(4) 副作用評価

続いて単独投与による副作用の検証を実施した。アルツハイマー病患者において xanomeline は嘔吐を誘発したが[27]、この作用は開発中止の原因の少なくとも一部に寄与していると推察される。一方で、ムスカリン受容体サブタイプのうち M_1 受容体は嘔吐に関与していることが知られていることから[35]、 M_1 作動性を有する化合物 **1** の嘔吐誘発作用を検証することは重要である。しかしながら、ラットやマウスといったげっ歯類では嘔吐反射が認められないため評価に用いることができない。このように嘔吐反射には種差が存在することから、嘔吐誘発作用の検証はカニクイザルを用いて実施した (図 16)。3 頭のサルに xanomeline または化合物 **1** を投与した後に一般症状観察を実施した結果、xanomeline 投与群では、全ての個体において嘔吐、流涎、縮瞳といった、ムスカリン受容体作動性に起因すると考えられる症状に加えて、発現メカニズムは不明であるが傾眠作用を誘発した。一方で、化合物 **1** 投与群では嘔吐、傾眠がいずれの個体においても認められず、流涎と縮瞳も認められた頭数は、それぞれ 2 頭と 1 頭で、程度は軽微であった (表 2)。以上の結果より、化合物 **1** の M_1 作動性を部分的にしたことにより、嘔吐が誘発されなかった可能性が示唆された。しかしながら、嘔吐発現に関与する受容体は M_1 受容体だけでなく他にも複数存在するため、嘔吐と M_1 受容体の関係を考察するには更なる検証が必要である。また、流涎においては主に M_3 受容体、部分的に M_1/M_4 受容体が、縮瞳においては M_3 受容体が寄与している可能性が示唆されている[36]。これらの知見から、化合物 **1** は、 M_1/M_4 受容体の部分作動薬であり、かつ M_3 受容体作動性が乖離しているために、流涎と縮瞳の副作用の発現が減弱されたと考えられる。そこで、流涎誘発作用を定量的に評価するため、マウスを用いた唾液分泌量の測定を実施した。その結果、xanomeline は有意に唾液分泌を亢進したが (図 17A)、化合物 **1** では軽微な唾液分泌しか認められず (図 17B)、カニクイザルにおける試験と同様の傾向が認められた。カニクイザルでの試験結果と併せて考慮すると、少なくとも化合物 **1** は、xanomeline よりも腺分泌に関する懸念が小さいと考えられる。

最後に、中枢性のコリン性副作用である痙攣および振戦誘発作用を検証するため、同じくマウスを用いて一般症状観察を実施した。その結果、xanomeline (100 mg/kg) は痙攣を誘発しなかったが、投与後 1 時間において軽微な振戦が認められた。一方で、化合物 **1** (100 mg/kg) は痙攣、振戦ともに誘発しなかったことから

(表 3)、M₁/M₄ の作動性を部分的にしたことにより痙攣や振戦誘発作用を乖離できた可能性が示唆された。



図 16 カニクイザル

		嘔吐	流涎	縮瞳	傾眠
Xanomeline	1 mg/kg	2 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3
	3 mg/kg	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3
化合物1	1.5 mg/kg	0 / 3	2 / 3	1 / 3	0 / 3
	6 mg/kg	0 / 3	2 / 3	1 / 3	0 / 3

表 2 カニクイザルを用いた一般症状観察(n = 3)。

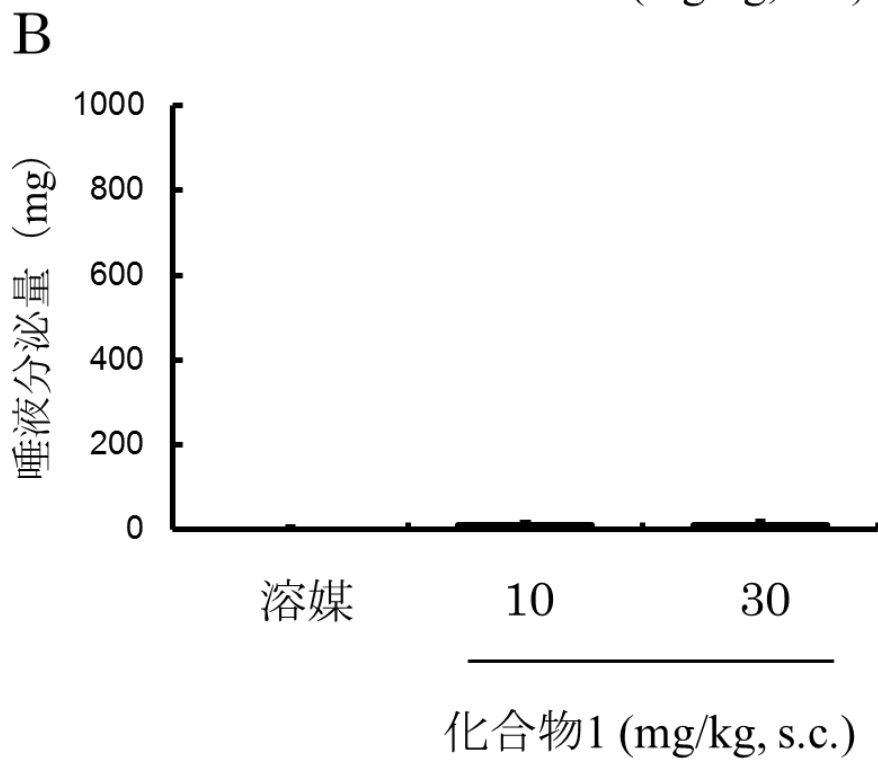
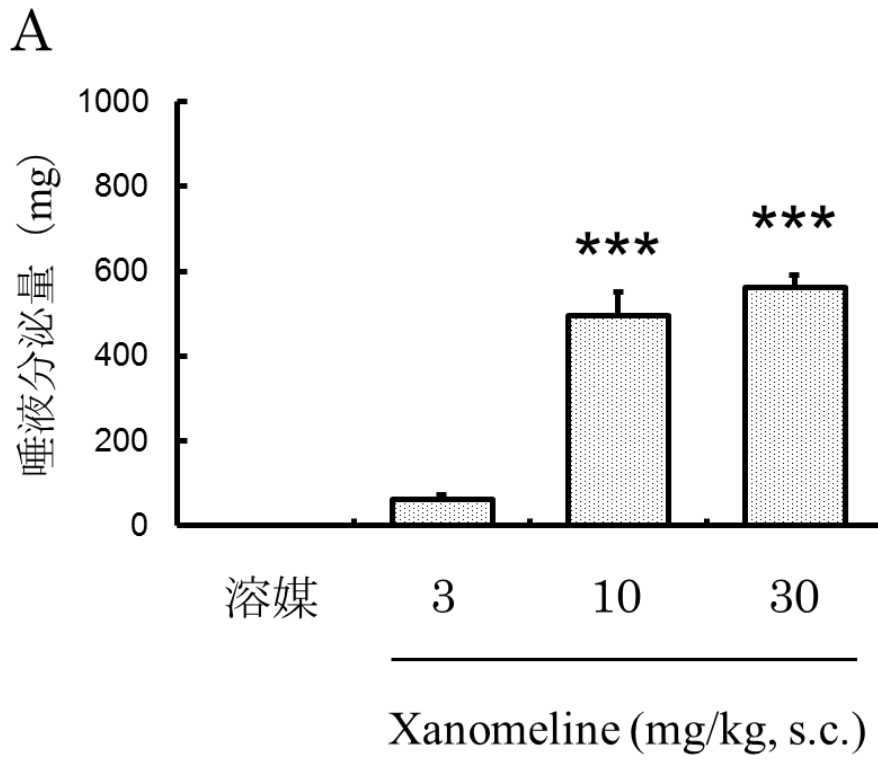


図 17 Xanomeline (A)、および化合物 1 (B)がマウスにおける唾液分泌量に及ぼす作用。 (n = 3-5)。 *** $P < 0.001$ (Dunnett test).

		痙攣	振戦
Xanomeline	100 mg/kg	0 / 3	3 / 3 (軽微)
	300 mg/kg	0 / 3	3 / 3 (軽微)
化合物1	30 mg/kg	0 / 3	0 / 3
	100 mg/kg	0 / 3	0 / 3

表3 マウスを用いた一般症状観察(n = 3)。

(5) 小括

以上、本章では著者らが見出した M_1/M_4 受容体選択的部分作動薬、および M_4 受容体選択的作動薬を用いて行動薬理学的評価を行った結果、 M_4 受容体作動性が、MAP 試験において抗精神病様作用を示すことを明らかにした。また、 M_4 受容体作動性が部分的であっても、 M_4 作動性が強力な xanomeline と同等に抗精神病様作用を示すことを明らかにした。一方、xanomeline において認められた既存薬誘発カタレプシーの増悪化は、 M_4 受容体作動性を部分的にすると消失し、既存抗精神病薬との併用が可能である事が示唆された。また、 M_1 受容体作動性を部分的にしたことや、 M_2/M_3 受容体作動性を乖離したことで、嘔吐、流涎、および縮瞳といったムスカリン受容体作動性に起因すると考えられる副作用を回避、または軽減できたことを、カニクイザルなどを用いた一般症状観察で証明した。

第2章 コモンマーモセットを用いた

認知機能障害モデルの作製

第1節 背景

(1) 認知機能障害に関する病態モデルの現状

統合失調症における認知機能障害は、患者の社会復帰に大きな影響を及ぼす中核症状の一つである(図3)。従って、認知機能障害の改善は極めて重要な課題であるが、現在使用可能な抗精神病薬は、陽性症状には一定の薬効を示す一方で認知機能障害には十分ではない[38, 39]。しかしながら、これまでになされてきたげっ歯類を対象とした認知機能評価試験において、臨床現場における実情に反して既存薬は病態モデルに対して改善作用を示すことが報告されている[40, 41]。このように、げっ歯類とヒトとの間で結果の相違が認められた原因の一つとして、ヒトの認知機能を司っている脳部位が前頭前皮質(PFC)であることが挙げられる(図18)。非ヒト霊長類(NHP)ではPFCの発達が進み、機能に応じて背外側部、内側部、および眼窩部と分類できる。一方で、げっ歯類はNHPと比較して皮質部が未発達であることに加えて、機能に応じた細分化も不十分であり、そもそもげっ歯類にはPFCが存在するののかといった議論もなされているほどである[42]。実際、全皮質部に占めるPFCの割合は、ヒトでは30%弱、マカクザルでは11%であるのに対して、げっ歯類では2%以下であり、げっ歯類におけるPFCはNHPに比べて未発達である[43]。従って、げっ歯類はNHPとは異なる神経回路で認知機能を実行しており、これがげっ歯類とヒトの間で、認知機能評価における結果が乖離していることに繋がっている可能性が考えられる。以上のことから、PFC機能障害が原因と考えられる認知機能障害の治療薬を開発する上では、げっ歯類だけでなく、脳構造がより発達しているNHPを用いた病態モデルによる薬効評価を実施することが、薬剤のヒトでの薬効予測精度を向上させるために重要であると考えられている。

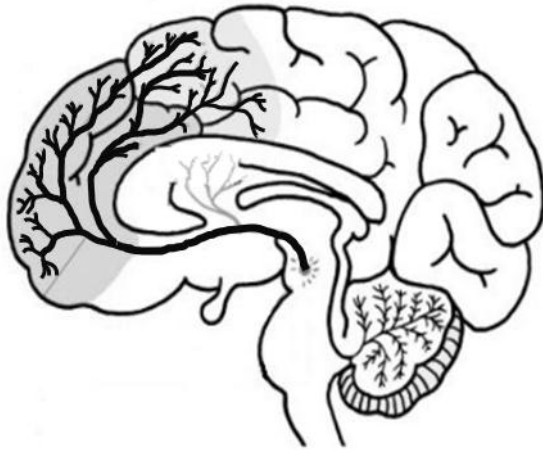


図 18
脳における PFC の部位

(2) NMDA 受容体による認知機能障害の惹起

Ketamine や PCP といった NMDA 受容体阻害薬 (図 19) は、健常人に投与すると幻覚や妄想、感情鈍麻、思考障害などといった統合失調症様症状を惹起することが知られている[44, 45]。また、認知機能障害は複数の認知機能ドメインに分類することができるが[38]、そのうち作業記憶を評価する n-back 課題について、課題実施中は PFC 機能が亢進することが報告されている[46, 47]。このように PFC 機能依存的な課題である n-back 課題において、ketamine は健常人における成績を悪化させたことから[48]、統合失調症患者の認知機能障害は、PFC における NMDA 受容体機能低下を介したグルタミン酸神経情報伝達の異常に起因している可能性が考えられる。

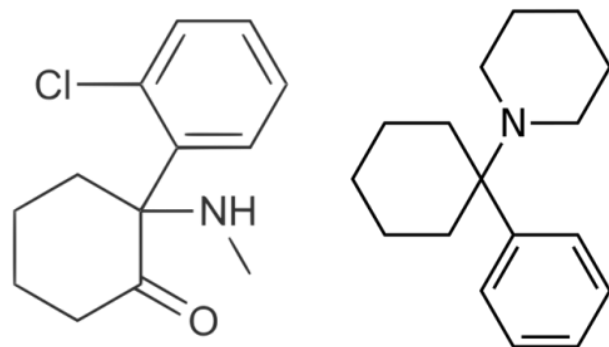


図 19
Ketamine および PCP の構造式

Ketamine

PCP

(3) コモンマーモセットを用いた認知機能障害モデル

NMDA 受容体阻害薬による、PFC 機能障害が関与すると考えられる認知機能障害は、NHP においても同様に惹起されることが報告されている[49-51]。従って、NHP を用いた NMDA 受容体拮抗薬誘発認知機能障害モデルは、非臨床試験から臨床試験への橋渡し研究において、表面妥当性や構成概念妥当性を備えた有用な薬効評価系となり得ると考えられる。NHP を用いたこれまでの認知機能評価では、その多くでアカゲザルをはじめとした大型サルが用いられてきた。しかしながら大型サルは取り扱いが困難であり、また試験に供する被験物質が大量に必要となり、複数化合物のスクリーニングに使用することは困難である。一方で、図 20 に示すような特長を有する小型サルであるコモンマーモセットは、遺伝学的、免疫学的にヒトと近接しており、また全皮質部に対する PFC が占める割合は 9%と、大型のマカクザル並みの発達が認められる。また霊長類では初となる遺伝子改変マーモセットも作製されており[52, 53]、実験動物として近年大きな注目を浴びている。著者の知る限りでは、これまでにマーモセットを用いた ketamine 誘発認知機能障害モデルに関する報告はなされていない。



- ブラジル東部に生息する新世界ザル
- 老齢ラット程度の体重 (~500g)
- 昼行性、社会性行動を示す
- げっ歯類と比較して脳構造が発達
- 大型サルと比較して扱いやすい
- 生涯出産数がげっ歯類程度 (~80匹)
- トランスジェニック技術導入が可能

図 20 コモンマーモセットの特長

(4) CANTAB を用いた行動薬理評価

NHP の認知機能を評価する手法はこれまでに数多く報告されているが、表面妥当性の高い病態モデルを作製するためには、ヒトで用いられているものと同様の手法を用いて病態を惹起することが望ましいと考えられる。CANTAB (図 21) はタッチパネルを用いた認知機能評価バッテリーであり、記憶能力や注意機能、実行機能など、評価したい認知機能ドメインに応じて課題を選択できる。第 2 章では、CANTAB に含まれる空間作業記憶 (SWM) 課題を用いて病態モデルの作製を試みた (図 21)。SWM 課題は臨床試験において最も使用されている課題の一つであり [54]、統合失調症患者において SWM 課題における成績低下が認められている [55]。また、SWM 課題は n-back 課題と同様に PFC 機能依存的と考えられていることから [56-58]、PFC 機能障害を惹起することが報告されている ketamine が、マーモセットにおいても SWM 課題において障害を惹起する可能性は十分に考えられる。

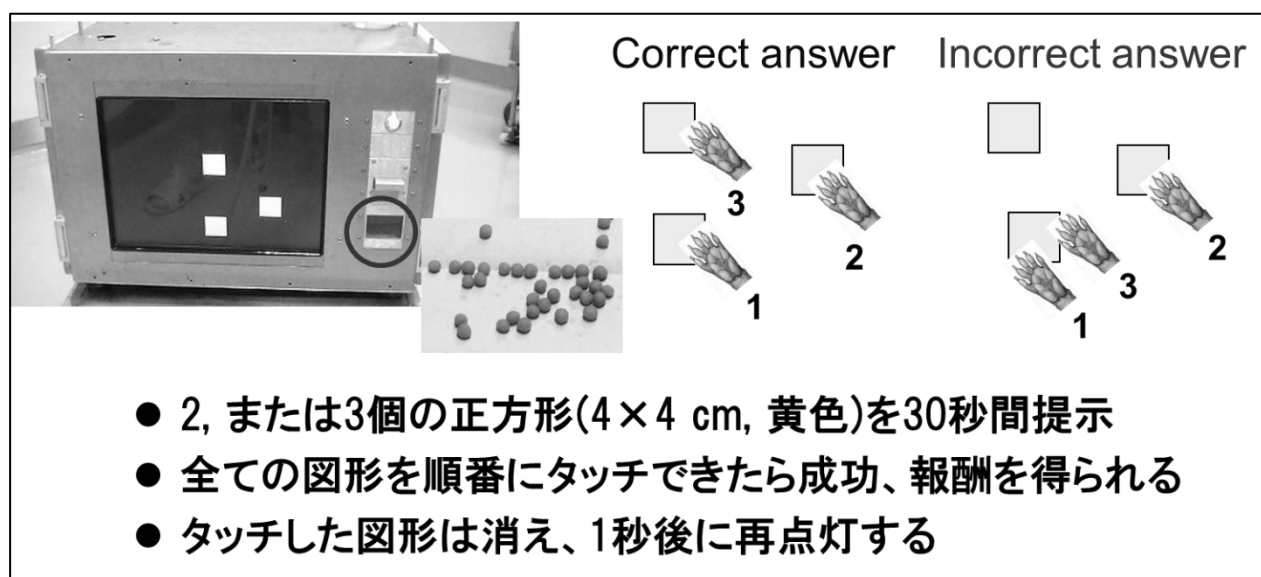


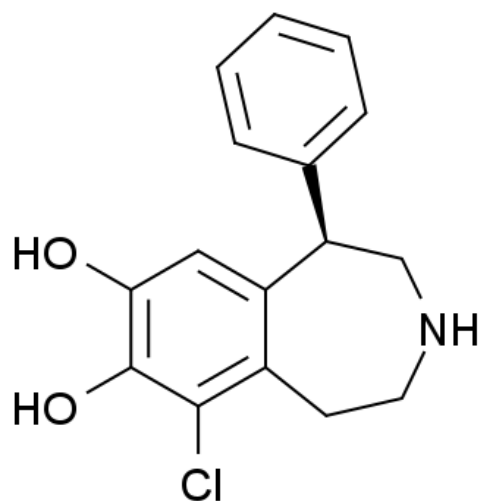
図 21 CANTAB のタッチパネル、および SWM 課題の手順

(5) 陽性対照の選定

病態モデルを作製する際には、ヒトにおける病態に対して改善作用を示す薬剤（陽性対照）の評価を実施し、そのモデルの予測妥当性を検証することが必要である。しかしながら、これまでに認知機能障害を適応とした薬剤は開発されていない。従って、本病態モデルにおいては、認知機能障害改善作用を示唆する報告が最もなされているメカニズムを有する化合物を評価することが望ましいと考えられる。第1章において用いたムスカリン受容体作動薬である xanomeline は、統合失調症患者における認知機能障害を改善したことから陽性対照となり得るが、種々の副作用の懸念があり動物愛護の観点から好ましくない。そこで本章では、統合失調症患者での改善報告はないものの最も有望なターゲットの一つとして考えられているドパミン D₁ 受容体作動薬を用いた。D₁ 受容体は PFC において D₂ 受容体の数倍発現しており、Sawaguchi と Goldman-Rakic は、NHP において D₁ 受容体拮抗薬を局所投与すると作業記憶課題に障害が認められることを明らかにした[59]。さらに別のグループによる報告では、マカクザルにおける ketamine 誘発作業記憶障害を D₁ 受容体作動薬が改善することを明らかにしている[60]。また、ヒトでは D₁/D₂ 受容体作動薬が作業記憶課題における成績を向上させたのに対して、D₂ 受容体選択的作動薬は無効であったことから、作業記憶の過程には主に D₁ 受容体を介した神経伝達が寄与している可能性があることが報告されている[61]。

以上のことから、本章において著者は、簡便で妥当性の高い評価系を構築することを目的として、マーモセットを用いた SWM 課題における ketamine 誘発認知機能障害モデルの作製を試みた。さらに、本病態モデルにおいて陽性対照となり得る化合物として、D₁ 受容体作動薬である SKF-81297 (図 22) の作用を検証した。

図 22
SKF-81297 の構造式



第2節 実験結果および考察

(1) トレーニング

マーモセットが課題を実行できるようにするためのトレーニングを実施した。トレーニング開始当初は、マーモセットは2 図形課題を正確に実行することができなかったが、トレーニングの継続により成績は徐々に上昇し、3 図形課題において安定して高い **success rate** を示すようになるまで実施した (結果省略)。以降の試験に使用できるまで1-3 ヶ月の期間を要した。

(2) Ketamine 用量の設定

次に、ketamine の最適用量の検証を行った。Ketamine は麻酔薬としても用いられるため、仮に動物が麻酔作用により課題を実行できなくなれば **success rate** は低下し、見かけ上認知機能障害が惹起されたことになる。従って、ketamine の作用が偽陽性となることを避けるため、麻酔作用をできるだけ排除した条件で評価を実施しなければならない。Ketamine を筋肉内投与した30分後に、画面に表示される1 図形を触るという課題 (1 図形課題) を10 試行実施し、それを15分以内に完遂できなくなるまで増量して繰り返し評価を行った。表4に示すように、完遂できた最大用量を各個体における ketamine 投与量とした。この用量の ketamine 投与により、直ちに自発運動量の低下やふらつきが発現したが、投与30分後には消失した。全てのマーモセットは、1 図形課題を1 試行当り平均60秒以内に遂行した (表4)。なお、ketamine 投与を伴う実験は1週間当り1回実施した。

(3) 2 図形課題における ketamine および SKF-81297 の作用

表4に示される用量の ketamine、および SKF-81297 を用いて評価を行った。その結果、図23に示されるように、個体番号63 (図23D)を除く全ての個体において、ketamine により2 図形課題における **Success rate** が有意に低下した。一方で、ketamine により認知機能障害が惹起された4頭のうち2頭において、SKF-81297 3 mg/kg による有意な改善作用が認められた (図23A, B)。また、個体番号205、206における障害も、それぞれ3または10 mg/kg のSKF-81297 投与によって改善される傾向が認められた (図23C, E)。

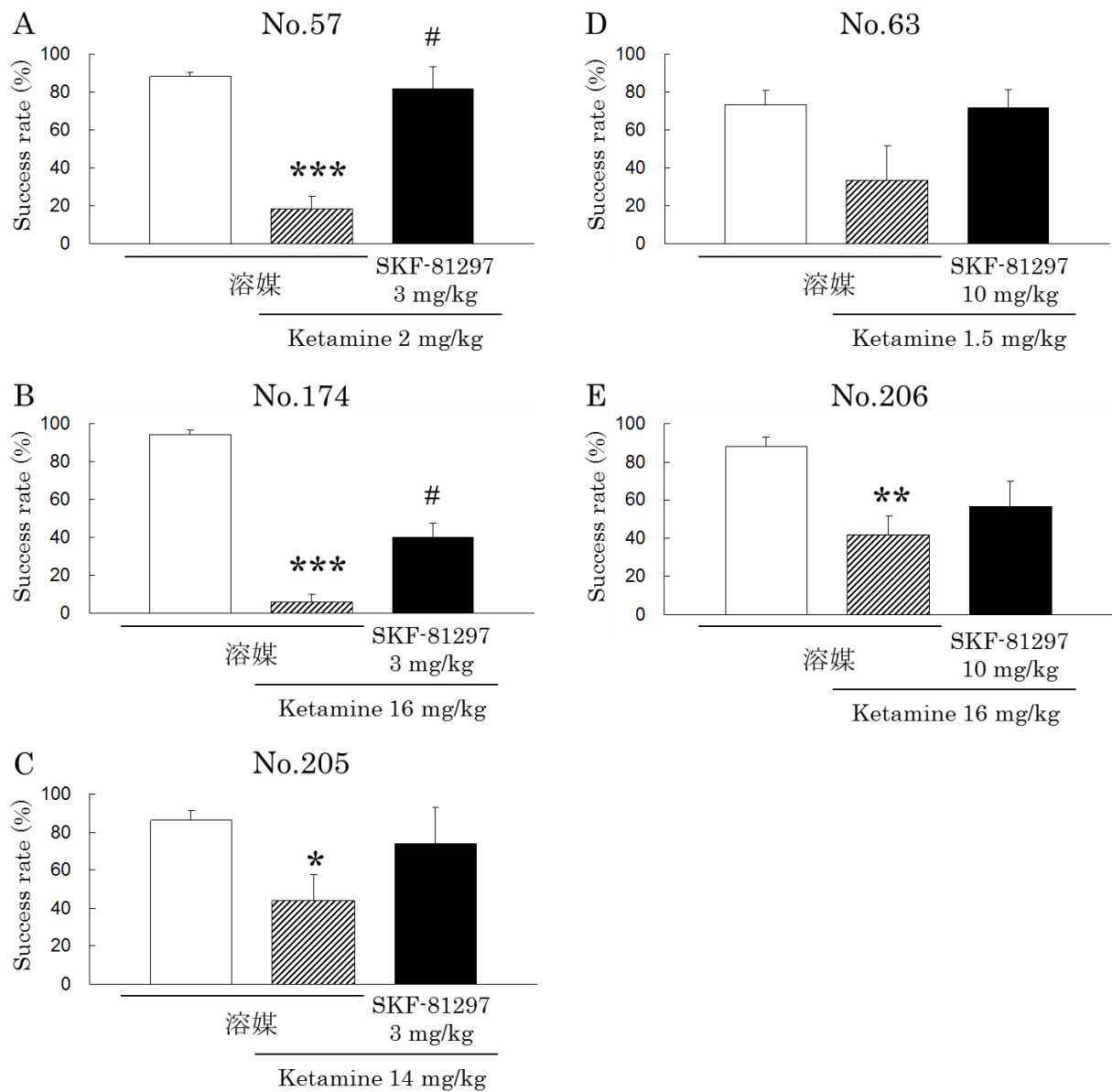


図 23

2 図形課題における、ketamine 誘発認知機能障害に対する SKF-81297 の作用 (n = 5–6 per marmoset)。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (paired t-test). # $P < 0.05$ (paired t-test).

(4) 3 図形課題における ketamine および SKF-81297 の作用

Success rate は ketamine により全ての個体において有意に低下した (図 24)。さらに、SKF-81297 3 mg/kg を投与した3頭では全ての個体において(図 24A-C)、10 mg/kg を投与した2頭ではそのうち1頭において (図 24D)、それぞれ有意な改善作用が認められた。残りの1頭においても、SKF-81297 による改善傾向が認められた (図 24E)。

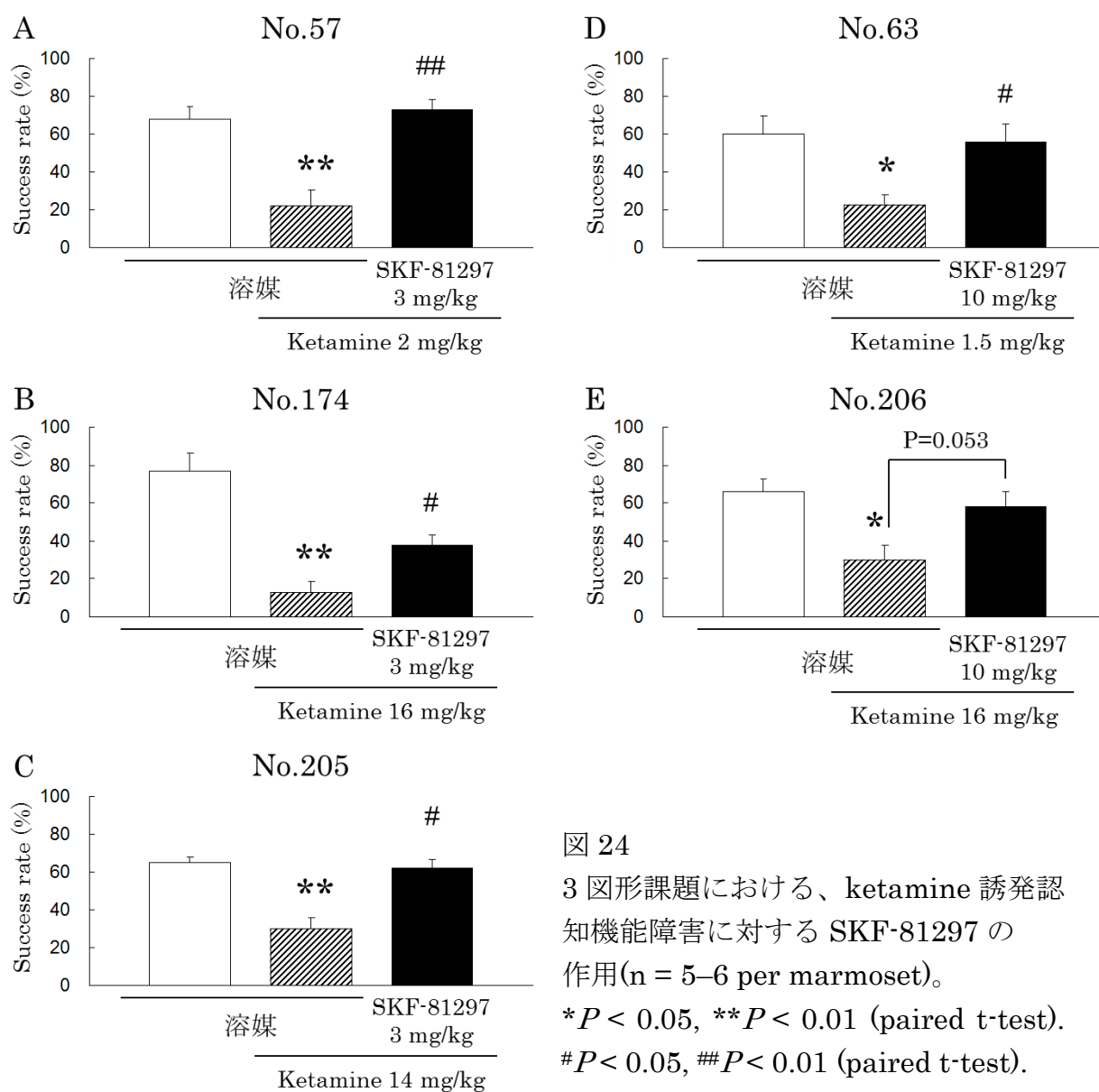


図 24
3 図形課題における、ketamine 誘発認知機能障害に対する SKF-81297 の作用(n = 5–6 per marmoset).
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (paired t-test).
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ (paired t-test).

(5) 2、および3 図形課題における ketamine および SKF-81297 の作用のまとめ
 全個体の結果をそれぞれ平均化すると、いずれの課題においても有意な ketamine による認知機能障害惹起作用、および SKF-81297 による改善作用が認められた (図 25)。

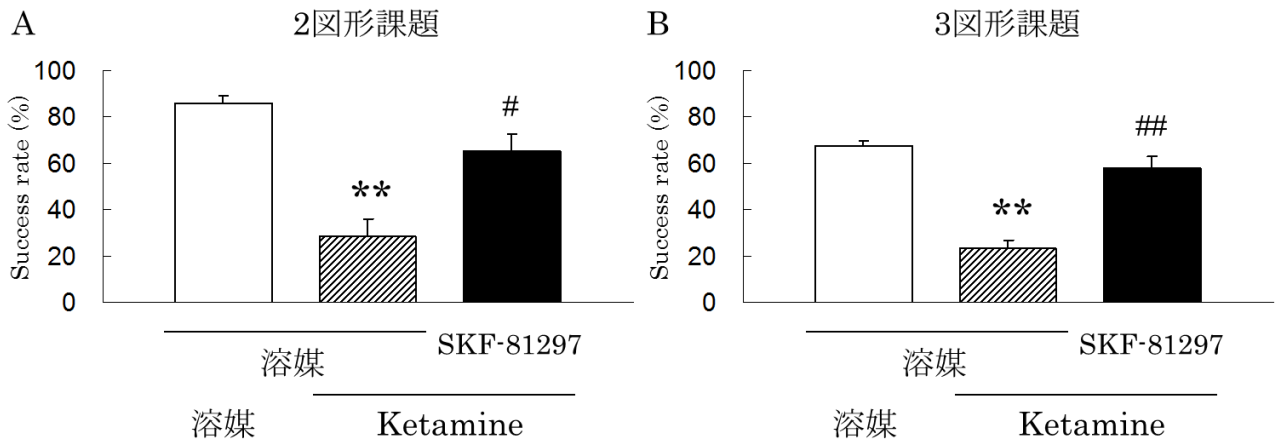


図 25

2、および3 図形課題における ketamine 誘発認知機能障害に対する SKF-81297 の作用の平均(n = 5)。 ** $P < 0.01$ (paired t-test), # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ (paired t-test).

(6) その他の結果と考察

表 4 に示されるように、全ての個体において ketamine による 2 図形課題における accuracy rate の有意な低下は認められなかった。しかしながら、3 図形課題においては 5 頭中 3 頭において有意な低下が認められた。さらに、SKF-81297 は個体番号 205 を除く全ての個体において有意な改善作用を示した。また、ketamine は両課題のいずれか、または両方において、4 頭の omission の発現を有意に増加させた。一方で、不正解試行数の割合は個体番号 206 においてのみ、ketamine による有意な増加が認められた。1 試行を正しく完遂するまでに要した時間は、全ての個体において ketamine による延長が両課題で認められた。SKF-81297 は、個体番号 205 以外の個体において ketamine による omission の増加を抑制し、また個体番号 206 における不正解試行数の割合の増加を抑制した。

さらに、SKF-81297 3 mg/kg を投与された 3 頭のうち 2 頭において、ketamine による、1 試行を正しく完遂するまでに要した時間の延長が短縮された。先述したように、表 4 にある ketamine 用量を投与した際に、いずれの個体においても 1 図形課題を完遂できたことを考慮すると、本試験において認められた ketamine 誘発認知機能障害は、ketamine の麻酔作用によるものではないと考えられ、また、各個体の報酬を獲得しようとする意欲も ketamine により減退しなかったと考えられる。以上のことから、著者はマーモセットを用いた本評価系において、ketamine は運動機能低下に基づく成績悪化を惹起することなく、認知機能障害を誘発したことを示した。さらに、ketamine 誘発認知機能障害に対して D₁ 受容体作動薬が薬効を示すことを見出した。

本章において、個体間で ketamine の最適用量が異なった理由は不明である。ketamine は反復投与により耐性を形成することが報告されている[62]。本試験において ketamine は約 1 週間という比較的長い投与間隔を設けたものの、耐性の形成のしやすさにおける個体差が、ketamine の最適用量の違いに寄与している可能性は否定できない。また、2 図形課題において SKF-81297 が有意な改善作用を示したのは 2 頭の個体においてのみであった。この理由として、2 図形課題はマーモセットにとって容易な課題であったため、本課題における ketamine 誘発障害は、SKF-81297 の改善作用を評価できるほど十分に惹起されなかった可能性が考えられる。実際、1 頭において ketamine による Success rate の有意な低下は認められず、また 2 図形課題における溶媒投与時の 5 頭の成績の平均は $85.8 \pm 2.8\%$ と、3 図形課題における成績 ($67.2 \pm 2.3\%$) よりも高い成績であった。

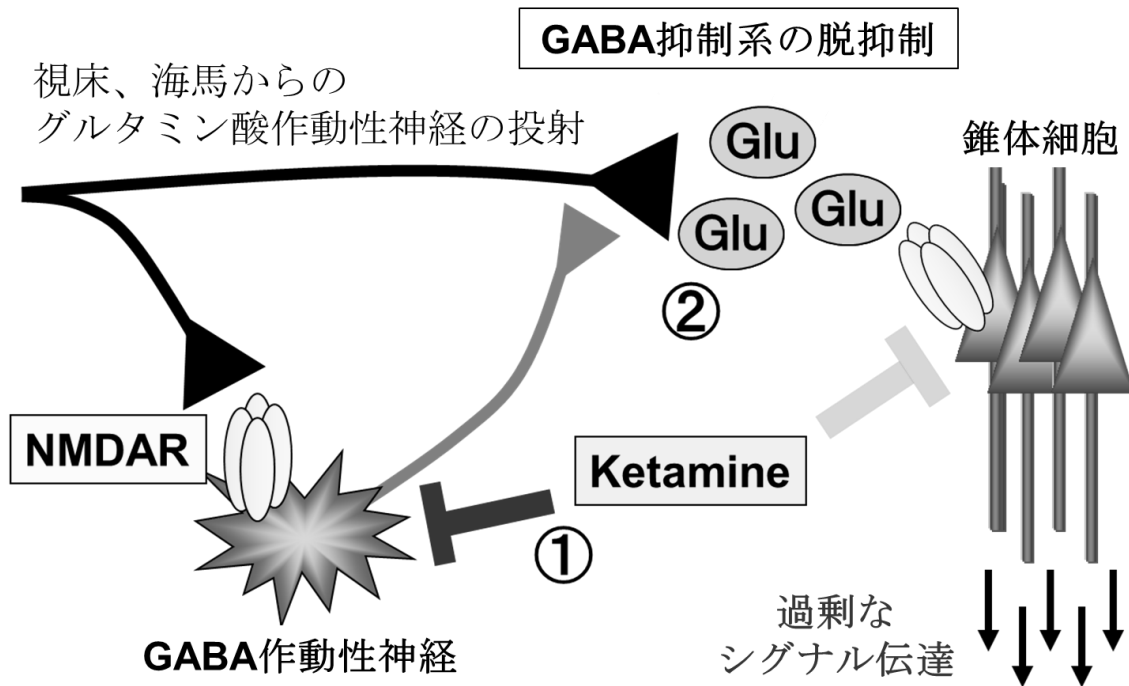
(7) 作用メカニズムの推定

PFC における錐体細胞は、グルタミン酸作動性の興奮性入力と、GABA 作動性の抑制性入力のバランスにより制御されている。Ketamine を含む NMDA 受容体阻害薬は、錐体細胞上よりも GABA 作動性介在神経上の NMDA 受容体に選択的に作用することが知られており [63]、また NMDA 受容体阻害薬によりラットの皮質部においてグルタミン酸の遊離が亢進することが報告されている [64, 65]。これは NMDA 受容体阻害薬による GABA 作動性神経の抑制により、神経回路の脱抑制が惹起されたことが原因であると考えられる。一方で、臨床試験において統合失調症患者の PFC における GABA 作動性神経の機能低下が認められており [66]、統合失調症患者において興奮性、および抑制性入力のバランスが保たれていないことが示唆される。以上のことを考慮すると、GABA 作動性介在神経の機能低下による過剰なグルタミン酸作動性神経伝達が、統合失調症の発症メカニズムに寄与している可能性が考えられる (図 26)。また、解剖学的検証を行った報告によると、D₁ 受容体は PFC において前シナプス性に発現しており [67]、別の研究グループはその D₁ 受容体の賦活化によりグルタミン酸の遊離が抑制されることを明らかにしている [68, 69]。これらの知見から、本章において SKF-81297 は PFC における ketamine によるグルタミン酸遊離亢進を抑制したことにより、ketamine 誘発認知機能障害を改善した可能性が考えられる (図 27)。

(8) 小括

以上、本章では CANTAB に含まれる SWM 課題を用いてマーモセットの認知機能を評価した結果、ヒトおよび他の NHP と同様に、マーモセットにおいても ketamine により障害が惹起されることを初めて明らかにした。さらに認知機能改善作用を有する可能性が示唆されている D₁ 受容体作動薬が、マーモセットにおける同障害を改善することを示した。これらの知見、および、マーモセットは取り扱いが容易で、必要な被験物質量は少量であるといった利点を考慮すると、本章において作製した認知機能障害モデルは簡便で実用的な評価系となり得ることが示唆された。

-Ketamineによる神経回路の異常-

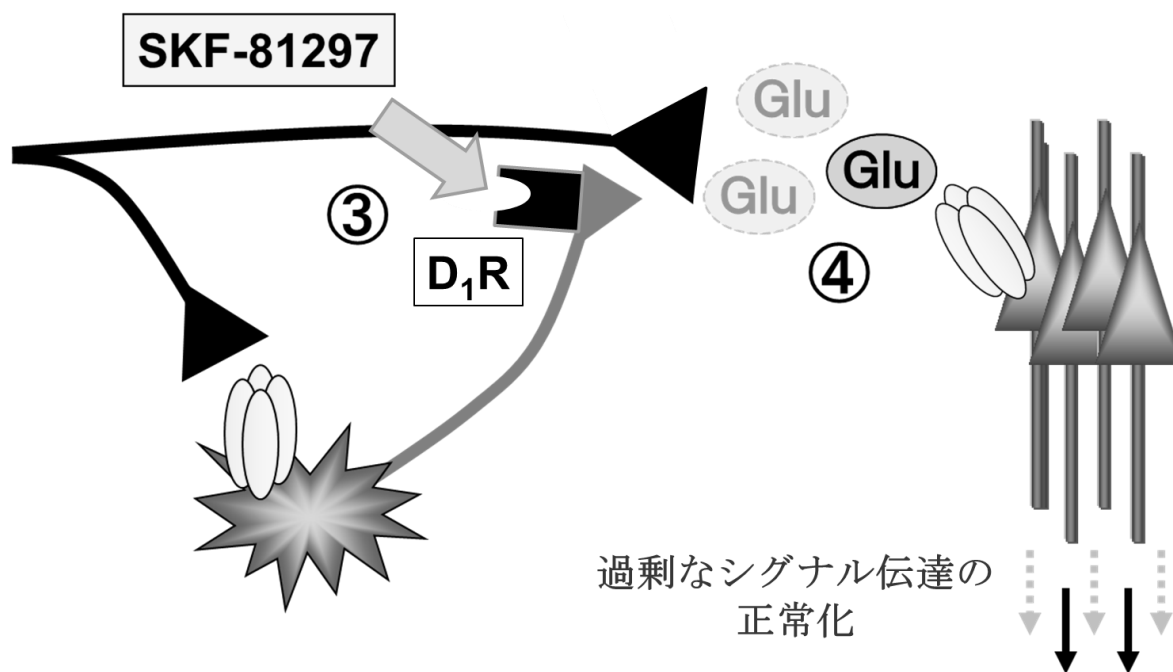


- ① Ketamineは、抑制性神経であるGABA作動性神経上のNMDA受容体を優先的に阻害する。
- ② グルタミン酸の遊離が亢進する。

図 26

PFCにおける ketamine の想定される作用メカニズム

-D₁受容体作動薬による改善作用-



- ③ D₁受容体は前シナプス性に発現する。
- ④ D₁受容体賦活化によりグルタミン酸遊離亢進が抑制される。

図 27
SKF-81297 の想定される作用メカニズム

表 4
本章における個体状況のまとめ

Subject No.	Age	Sex	Treatment (mg/kg)		Mean correct response latency in 1-circle task ^a	Task	Treatment group	% Accuracy ^b		% Incorrect responses /total trials	% Omissions /total trials	Correct response latency	
			SKF-81297	ketamine				%	n			time (msec)	n ^c
57	10	♀	3	2	50.6	2-square	1st veh.	90.0±0.0	4	12.0±2.0	0.0±0.0	7416±729	8.8±0.2
							ketamine	61.1±16.6		18.0±9.7	64.0±15.7 [*]	13945±3919 ^{**}	2.0±0.9 ^{***}
174	5	♀	3	16	29.2	3-square	SKF/ketamine	86.7±8.2	5	8.0±4.9	10.0±7.7 [#]	12667±1215	8.0±1.0 [#]
							1st veh.	70.0±6.3		29.0±6.0	3.0±2.0	12280±1040	13.8±1.3
							ketamine	30.8±9.6 ^{**}		33.0±6.8	45.0±14.4 [#]	16292±1947	4.4±1.7 ^{**}
							SKF/ketamine	74.8±6.0 [#]		25.0±6.1	2.0±2.0 [#]	11121±839	14.8±0.6 ^{###}
205	4	♀	3	14	21.4	2-square	1st veh.	95.0±2.9	4	6.0±2.4	0.0±0.0	7562±540	9.4±0.2
							ketamine	37.5±23.9		16.0±11.2	78.0±10.2 ^{***}	24527±5914 ^{***}	0.6±0.4 ^{***}
							SKF/ketamine	89.6±6.3		10.0±4.5	50.0±8.9	14483±1368 [#]	4.0±0.7 [#]
							1st veh.	78.8±11.8	4	23.0±9.3	0.0±0.0	12303±592	16.4±1.9
							ketamine	31.1±11.6		22.0±9.3	65.0±14.1 [#]	18455±3475 ^{**}	2.6±1.1 ^{**}
							SKF/ketamine	44.5±6.6		50.0±6.3	12.0±6.2 [#]	13776±1266	7.6±1.0 [#]
							1st veh.	82.5±4.8	4	14.0±5.1	0.0±0.0	6781±725	8.6±0.5
							ketamine	58.7±20.6		12.0±2.0	44.0±13.3 [*]	14926±1760 ^{***}	4.4±1.2 [*]
							SKF/ketamine	97.2±2.8		2.0±2.0	24.0±19.1	10324±1169 [#]	6.8±2.3
							1st veh.	65.0±2.7	5	35.0±2.7	0.0±0.0	8266±519	13.0±0.5
63	9	♀	10	1.5	30.0	2-square	ketamine	42.5±6.9 [*]		41.0±7.0	29.0±11.0	17728±1713 ^{***}	6.0±1.2 ^{**}
							SKF/ketamine	66.8±6.8		32.0±7.2	6.0±4.0	10123±703 ^{###}	12.0±1.1 [#]
							1st veh.	93.0±3.5	3	10.0±2.6	16.7±9.2	7679±932	7.3±0.8
							ketamine	96.3±3.7		1.7±1.7	65.0±19.3	13196±1519 ^{**}	3.3±1.8
206	4	♀	10	16	48.3	3-square	SKF/ketamine	75.7±9.7		15.0±5.6	13.3±8.8	11504±1113	7.2±0.9
							1st veh.	66.1±6.2	5	25.0±4.1	15.0±9.6	10293±890	12.0±1.8
							ketamine	50.8±10.6		24.2±7.9	53.3±10.6 [*]	9245±1037	4.5±1.1 [*]
							SKF/ketamine	65.4±8.6		26.7±7.0	17.5±9.4 ^{##}	11036±802	11.0±1.9 [#]
							1st veh.	88.3±4.8	6	11.7±4.8	0.0±0.0	7724±647	9.0±0.4
							ketamine	58.3±12.0		31.7±8.3	26.7±11.7	10455±1200 [*]	4.0±0.9 ^{**}
							SKF/ketamine	65.0±10.1		25.0±6.7	18.3±8.7	9448±1140	5.7±1.3
							1st veh.	66.2±6.2	6	33.3±5.9	0.8±0.8	8239±459	14.0±0.8
							ketamine	30.5±7.7 [*]		65.0±5.6 [*]	5.0±3.4	8621±873	6.0±1.6 [*]
							SKF/ketamine	60.5±7.3 [#]		37.5±6.9 [#]	4.2±2.7	10199±824	11.7±1.6

1st veh. = group administered vehicle; ketamine = group administered ketamine; SKF/ketamine = group administered SKF-81297 and ketamine

^a mean time required to correctly complete 10 trials in the 1-circle task after ketamine treatment

^b correct trials/response-positive trial(s)

^c mean number of successful trial(s)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the vehicle control group; [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$, ^{###} $p < 0.001$ compared with the ketamine-treated group

第3章 コモンマーモセットを用いた

自閉症スペクトラム障害モデルの作製、および

非定型抗精神病薬 lurasidone の作用検討

第1節 背景

(1) 自閉症スペクトラム障害を患った乳幼児に認められる症状

自閉症スペクトラム障害 (ASD) は、社会性や他者とのコミュニケーション能力に障害が認められたり、常同的で興味の範囲が限られた行動を取ったりすることを主な特徴とする発達障害の一種である。米国精神医学会により発表された、精神疾患の診断分類である DSM-IVにおいて、ASD は患者の知能や重症度に応じて図 6 のように分類されていたが、2013 年に発表された DSM-5 への改訂により、このような自閉症や広汎性発達障害、アスペルガー症候群といった分類は廃止され、ASD へと統合された。DSM-5 によると、ASD は表 5 に示されるような診断基準となっている。その中に「A.2. 他者との交流に用いられる非言語的コミュニケーションの障害」とあるが、これに関連して、自閉症スペクトラム障害を患った乳幼児 (ASD 児) では視覚的共同注視 (JVA) という「他者とともに事物に注意を配分し共有すること」と定義される社会的行動に異常が認められる (図 28) [70-73]。幼児における言語発達の基盤となる JVA には[74, 75]、受動的な responding to joint attention (RJA) と能動的な initiating joint attention (IIA) の 2 つの様式があり、これらの行動は健常児において生後数か月後から見られるようになる[76, 77]。RJA とは他者の視線、頭部姿勢、および指差し行動を追従し、その先にある対象への関心を共有する能力を指す。一方で、IIA とは乳幼児が自分の興味を他者と共有するために、興味の対象となっている物体などへ自発的に指差しを行う能力のことである。これまでに、RJA や IIA 機能を評価する試験において、健常児と比較して ASD 児では成績の低下が認められることが報告されており[78, 79]、これらの障害は ASD の初期に認められる兆候であると考えられている[72, 78]。

以下のA,B,C,Dを満たしていること。

A: 社会的コミュニケーションおよび相互関係における持続的障害
(以下の3点の特徴で示される)

1. 社会的・情緒的な相互関係の障害。
2. 他者との交流に用いられる非言語的コミュニケーションの障害。
3. 年齢相応の対人関係性の発達や維持の障害。

B: 限定された反復する様式の行動、興味、活動 (以下の2点以上の特徴で示される)

1. 常同的で反復的な運動動作や物体の使用、あるいは話し方。
2. 同一性へのこだわり、日常動作への融通の効かない執着、言語・非言語上の儀式的な行動パターン。
3. 集中度・焦点づけが異常に強くて限定的であり、固定された興味がある。
4. 感覚入力に対する敏感性あるいは鈍感性、あるいは感覚に関する環境に対する普通以上の関心。

C: 症状は発達早期の段階で必ず出現するが、後になって明らかになるものもある。

D: 症状は社会や職業その他の重要な機能に重大な障害を引き起こしている。

表5 DSM-5におけるASDの診断基準

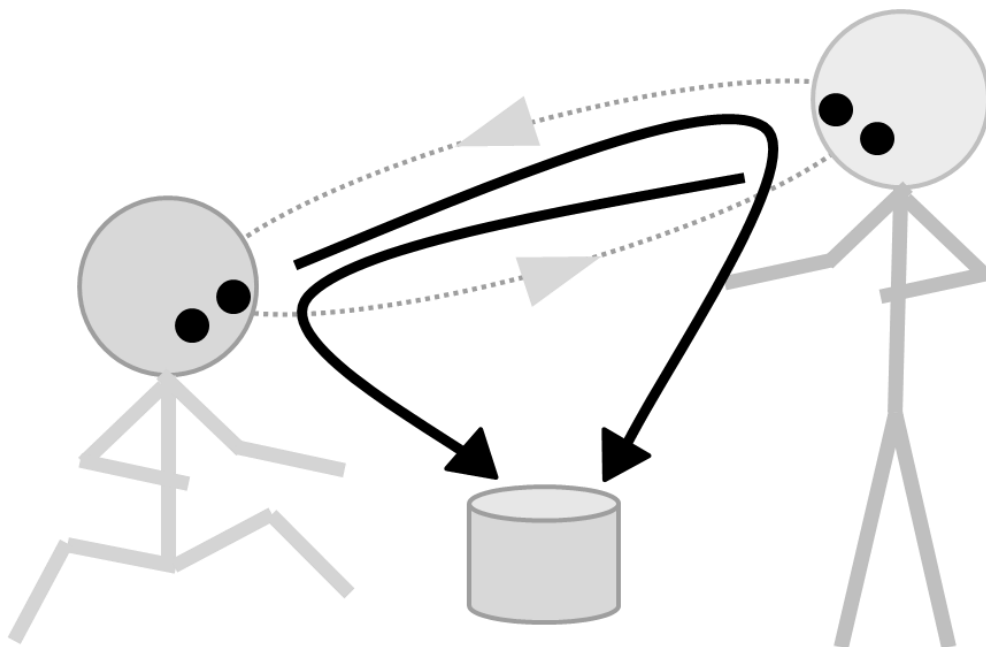


図28 JVAの概念図

(2) 自閉症スペクトラム障害病態モデルの現状

ASD 児における発達遅滞は社会的自立において重大な障壁となるが、これまでに ASD の主症状を適応として承認された薬剤は存在しない。この原因として、ASD の病態メカニズムがまだ解明されていないことに加えて、げっ歯類を用いた ASD 病態モデルにおける妥当性が複数の点で不十分であることが考えられる。まず、げっ歯類では捉えられる行動の種類に限界があることである。近年げっ歯類を用いた ASD モデルとして、バルプロ酸を投与された妊娠ラットから出生した仔がしばしば用いられている[80]。これはヒトにおいて、胎生期にバルプロ酸に曝露されると ASD の発症リスクが上昇するという報告に基づいて作製されたモデルであるが[81]、そのモデル動物が、「初見の個体に接近し、匂いを嗅いだり舐めたりした時間」を社会的相互性の指標としており、実際の患者で認められる症状とは異なる。また、ASD 児において認められる JVA 障害といった複雑な行動異常を、げっ歯類を用いて捉えることは困難である。一方で、生後数か月の健常児において、JVA 実施中に背内側 PFC の賦活化が認められるのに対し[82, 83]、ASD 児では PFC 機能障害が認められることから[84]、ASD 児において JVA の正常な実施が困難である理由の一つとして PFC の機能異常が推測される。ところが、第 2 章においても論述したように、げっ歯類の PFC は未発達であり[42, 43]、PFC 機能障害を指標とした試験の実施は困難である。以上の理由から、げっ歯類を用いた試験の結果をもとに、ASD に対する薬効を予測することには限界があると考えられる。一方で、これまでにチンパンジーやアカゲザル、ニホンザルといった NHP は JVA (RJA) を実行可能であると報告されている[85-87]。JVA のようにヒトと NHP とで共通して見られる行動を指標にして、PFC の発達が認められる NHP を用いた検証をすることは、げっ歯類とヒトとの間で乖離する結果を繋ぐために重要であると考えられるが、第 2 章で用いたコモンマーモセットが JVA を実行可能であるかについての報告はない。

(3) NMDA 受容体機能低下に注目した自閉症スペクトラム障害病態モデルの作製

第2章でも論述したように、NMDA 受容体の機能異常は統合失調症に関与していることが報告されているが、近年ではそれが ASD にも関与している可能性が示唆されている[88-91]。また、NMDA 受容体阻害薬は、健常人において複数の ASD 様症状を惹起し[88]、さらに、NMDA 受容体の positive modulator である d-cycloserine は、ASD モデルマウスである BTBR T+ Itpr3tf/J マウスにおいて社会的相互性障害を改善したと報告されている[91]。このように、ASD と NMDA 受容体機能低下の関係性が強く示唆されていることから、NHP に対する NMDA 受容体阻害薬投与により JVA 機能障害が認められるのであれば、当該実験系が、表面および構成概念妥当性を有する ASD の病態モデルになることが期待される。

(4) 陽性対照の選定

新たな ASD 病態モデルを作製する際には、陽性対照の評価が必要である。しかしながら、これまでに ASD の中核症状を適応とした薬剤は開発されていないことから、ASD の改善に繋がると考えられる作用メカニズムを有する化合物の評価を行い、その評価系の妥当性を検証する必要がある。その有力な候補化合物の一つとして、2010年に FDA に承認された抗精神病薬である lurasidone が挙げられる(図 29)。著者が所属する研究機関では、マーモセットを用いて行った、PFC 機能依存的と考えられる認知機能評価試験において、lurasidone 投与により成績が向上したこと[92, 93]、また、マイクロダイアリシス法を用いた実験で、lurasidone はげっ歯類の皮質におけるグルタミン酸遊離を亢進したことを報告している[94]。以上の知見と、グルタミン酸が NMDA 受容体に作用する生体内神経伝達物質であることなどを総合的に勘案すると、lurasidone が ketamine 誘発 JVA 機能障害を改善する可能性が考えられる。

以上のことから、本章において著者は、表面、および構成概念妥当性の高い

評価系を構築することを目的として、マーモセットを用いた ketamine 誘発 JVA 機能障害モデルの作製を試みた。さらに、ketamine 誘発 JVA 機能障害に対する lurasidone の作用を検証した。

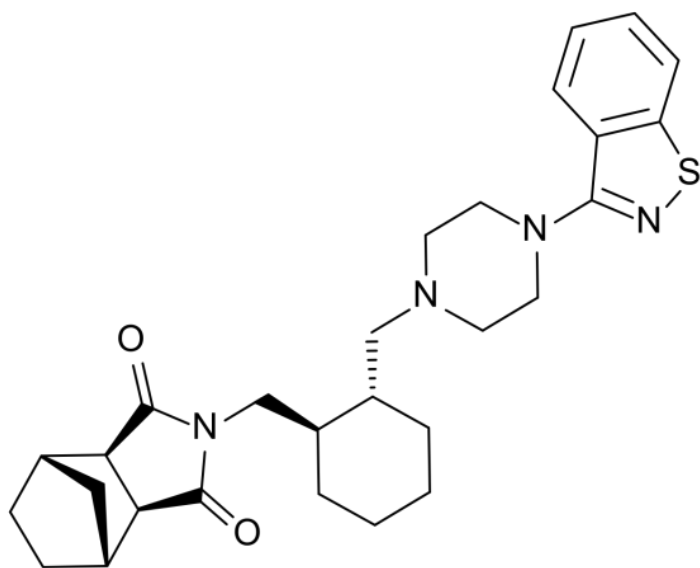


図 29
Lurasidone の構造式

第2節 実験結果および考察

(1) マーモセットにおける JVA 機能の有無

JVA 機能を測定するために図 30 に示す装置を作製した。この装置の四隅にある白色の箱には扉が取り付けられており、評価者はマーモセットへの合図として、正解の箱に指差し、視線を向ける。マーモセットはその箱の扉を開けると報酬が得られる (図 31)。マーモセットが報酬を得られるまでに不正解の箱を開けた回数を指標にして、JVA 機能をスコア化した (図 32)。

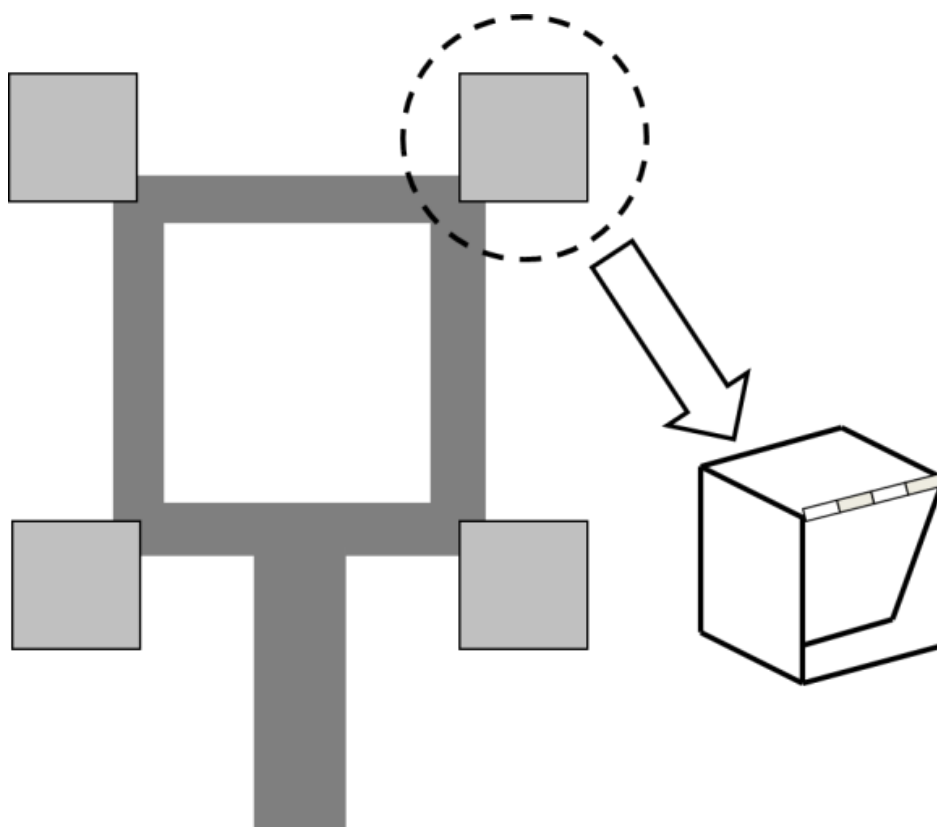


図 30
JVA 機能測定装置の模式図

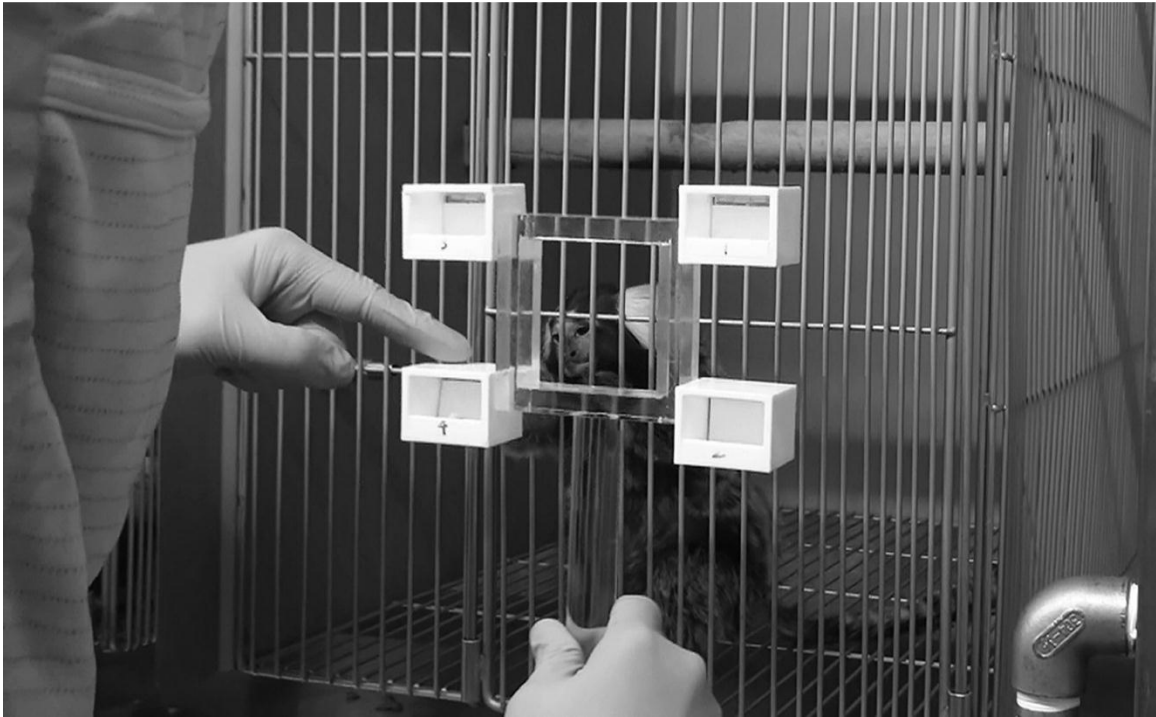


図 31 JVA 課題実施中の様子

スコア付け

誤答数(1試行)	0	1	2	>3
スコア	10	3	1	0

A 正解 B 例)
 正解 ... <A>
 マーモセットが開けた順 ... →<C>→<A>
 ⇒ スコアは "1" (2回間違えたため)

C D

1回の試験あたり8試行実施し、その平均値を算出した

図 32 スコア付けの方法

まず、合図の有無による JVA スコアの違いを指標にして、マーモセットも他の NHP と同様に JVA 機能を有するか検証した。図 33 に示すように、指差しや視線といった合図により、合図の提示をしなかったときと比較してスコアは有意に上昇した。また、合図の提示が無いときのスコアは期待値とほぼ同等であったことから、マーモセットも他の NHP と同様に JVA 機能を有していることが示唆された。なお、期待値は動物が無作為に箱を開けた時に期待されるスコアであり、以下のように算出した。

$$10(1/4) + 3[(3/4) \times (1/4)] + 1[(3/4) \times (3/4) \times (1/4)] = 3.20$$

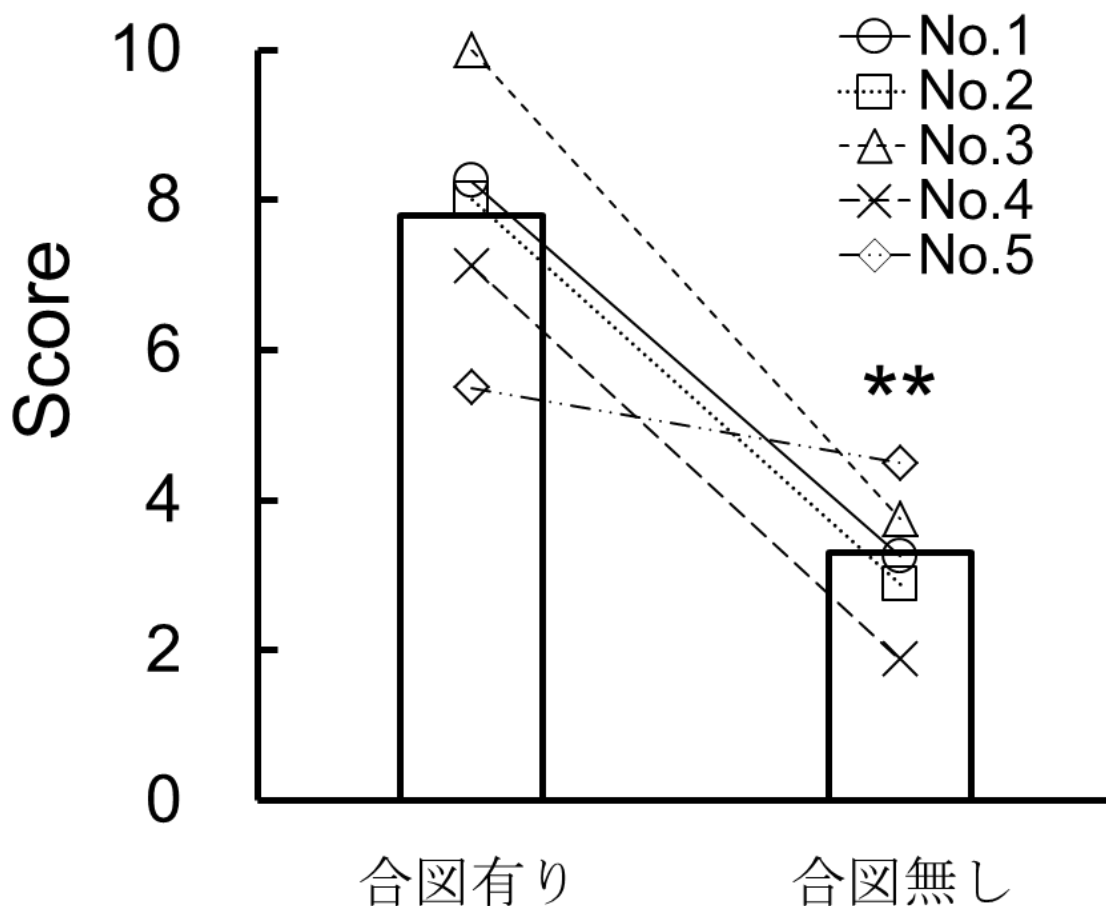


図 33

合図提示の有無の違いによる成績の変化。

** $P < 0.01$ (paired t-test).

(2) Ketamine 誘発 JVA 機能障害に対する lurasidone の作用

表 6 に示される用量の ketamine 投与により有意に JVA スコアが低下した (図 34A)。また、ketamine 投与により全ての個体において自発運動量の低下やふらつきなどが認められたが、30 分後にはそれらの行動変化は消失した。一方で、lurasidone は ketamine 誘発 JVA 機能障害を有意に改善した(図 34A)。なお、溶媒対照群と lurasidone/ketamine 投与群の間に有意差は認められなかった。また、lurasidone の作用評価には約 3 か月を要したが、その間の溶媒対照群のスコアを前半と後半とに分割して比較した結果、両群間で有意な差は認められなかったことから(表 6)、実験期間中の ketamine や lurasidone の反復投与は、各マーモセットの basal score に影響しなかったと考えられる。一方で、ketamine 誘発障害に対する lurasidone の作用評価に用いた 5 頭のうち、2 頭は既に別の試験に供していたため、残りの 3 頭を用いて lurasidone 単独投与による作用を検証した結果、JVA スコアの有意な上昇は認められなかった(図 34B)。従って、lurasidone それ自体に JVA 機能の亢進作用は無いと考えられる。以上の結果から、lurasidone が ASD 症状の少なくとも一部に有効である可能性が示唆された。

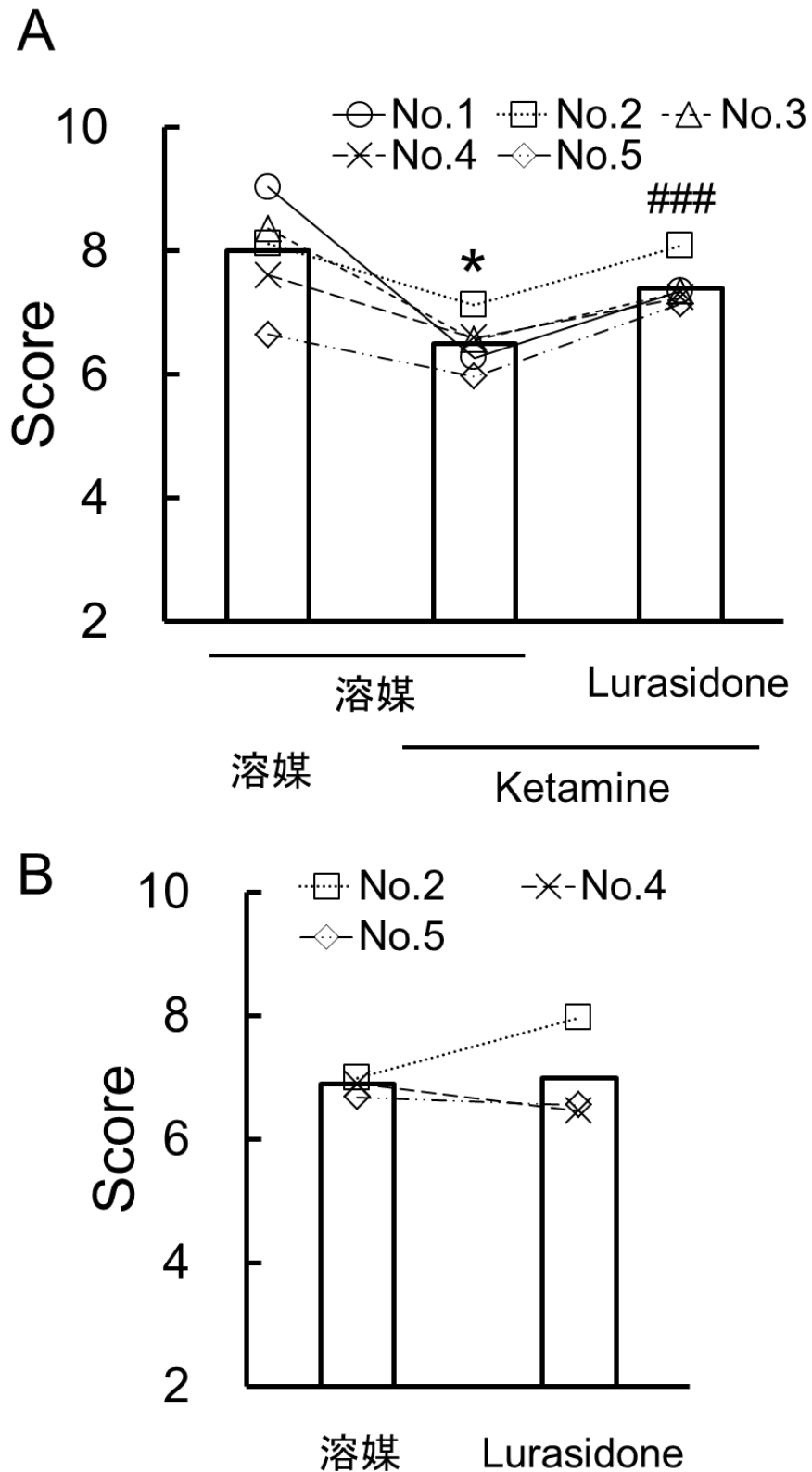


図 34

JVA 課題における成績。(A) Ketamine 誘発 JVA 機能障害に対する lurasidone の作用 (n = 4–6 per marmoset)。 (B) 無処置マーモセットにおける JVA 機能に対する lurasidone の作用。(n = 4 per marmoset)。 * $P < 0.05$ (paired t-test) ### $P < 0.001$ (paired t-test)。

Subject No.	Age	Sex	Treatment (mg/kg)	Score when administered vehicle/vehicle		
			Ketamine	First half	Second half	<i>P</i>
1	7	♂	10	8.98 (6)	9.08 (6)	
2	7	♀	1	8.28 (5)	7.91 (4)	
3	4	♀	4.5	8.17 (6)	8.60 (5)	
4	7	♀	3.5	7.03 (5)	8.20 (5)	
5	4	♂	2	6.43 (5)	6.94 (4)	
			Mean	7.77 ± 0.46	8.15 ± 0.36	n.s.

表 6

本章における個体状況のまとめ

(3) Ketamine は JVA 機能特異的に障害を誘発したか

Ketamine によりスコアが低下したが、それは JVA 機能特異的な障害というよりも、単なる健忘や注意機能の障害といった、JVA 機能非特異的な作用に起因している可能性も考えられる。もし前者が原因であれば、合図を実験者とのコミュニケーションを含まない様式に変更して同様の試験を実施すると、ketamine 投与によりスコアは低下しないと考えられるが、後者が原因であるならば同様の試験を実施するとスコアは低下すると予想される。そこで、JVA 試験における ketamine 誘発スコア低下は健忘などではなく、JVA 機能特異的な障害によるものであったのか検証するため、指差しや視線の代わりに、評価者とのコミュニケーションを含まない合図として電球を装着した装置を用いて、ketamine によりスコアが低下するか否か検証した (図 35)。

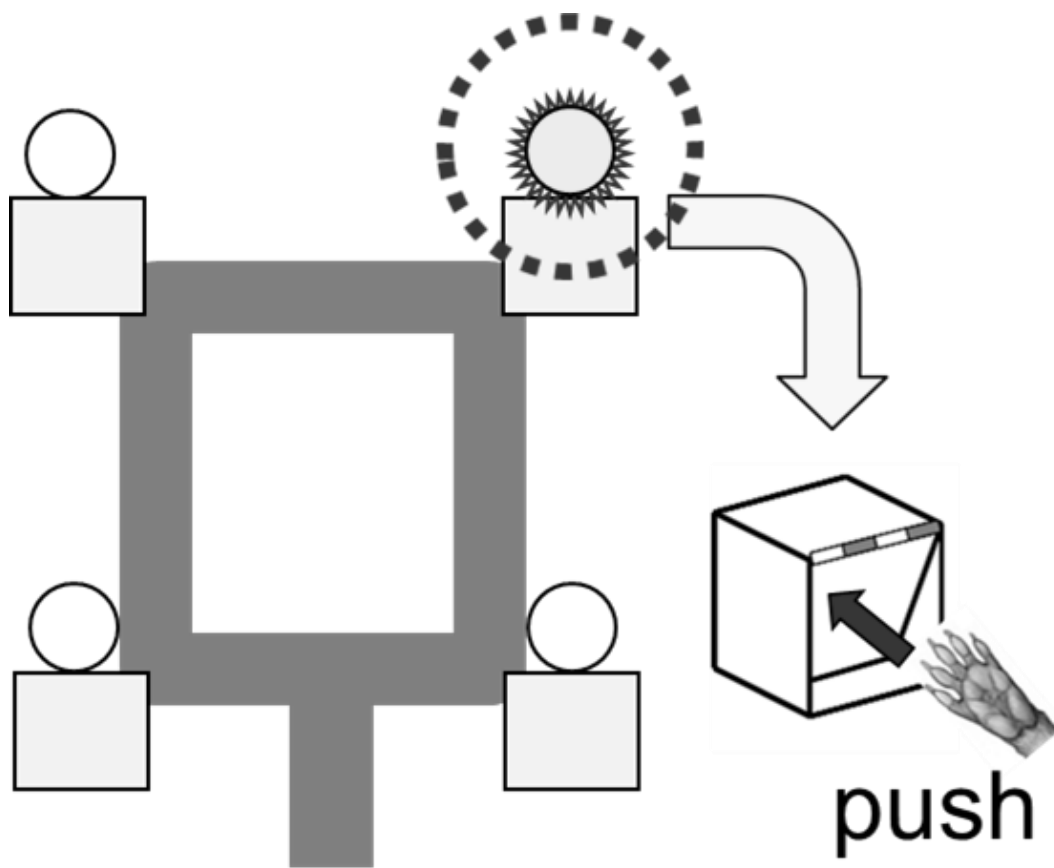


図 35 電球を設置した装置の模式図

Lurasidone の評価に用いた 5 頭のうち 1 頭は手順を学習できなかったため、本試験には使用しなかった。まず、電球による合図の有無によるスコアの違について検証した結果、合図を提示しなかったときと比較して、電球による合図を提示するとスコアは有意に上昇したことから、電球も指差しや視線と同様に合図として成立していることが示唆された(図 36A)。また、合図無しスコアは期待値とほぼ同等であった。一方で、表 6 に示される用量の ketamine 投与により、スコアの有意な変化は認められなかったことから(図 36B)、ketamine は健忘や注意機能障害を惹起したのではなく、JVA 機能に特異的な障害を誘発したことが示唆された。

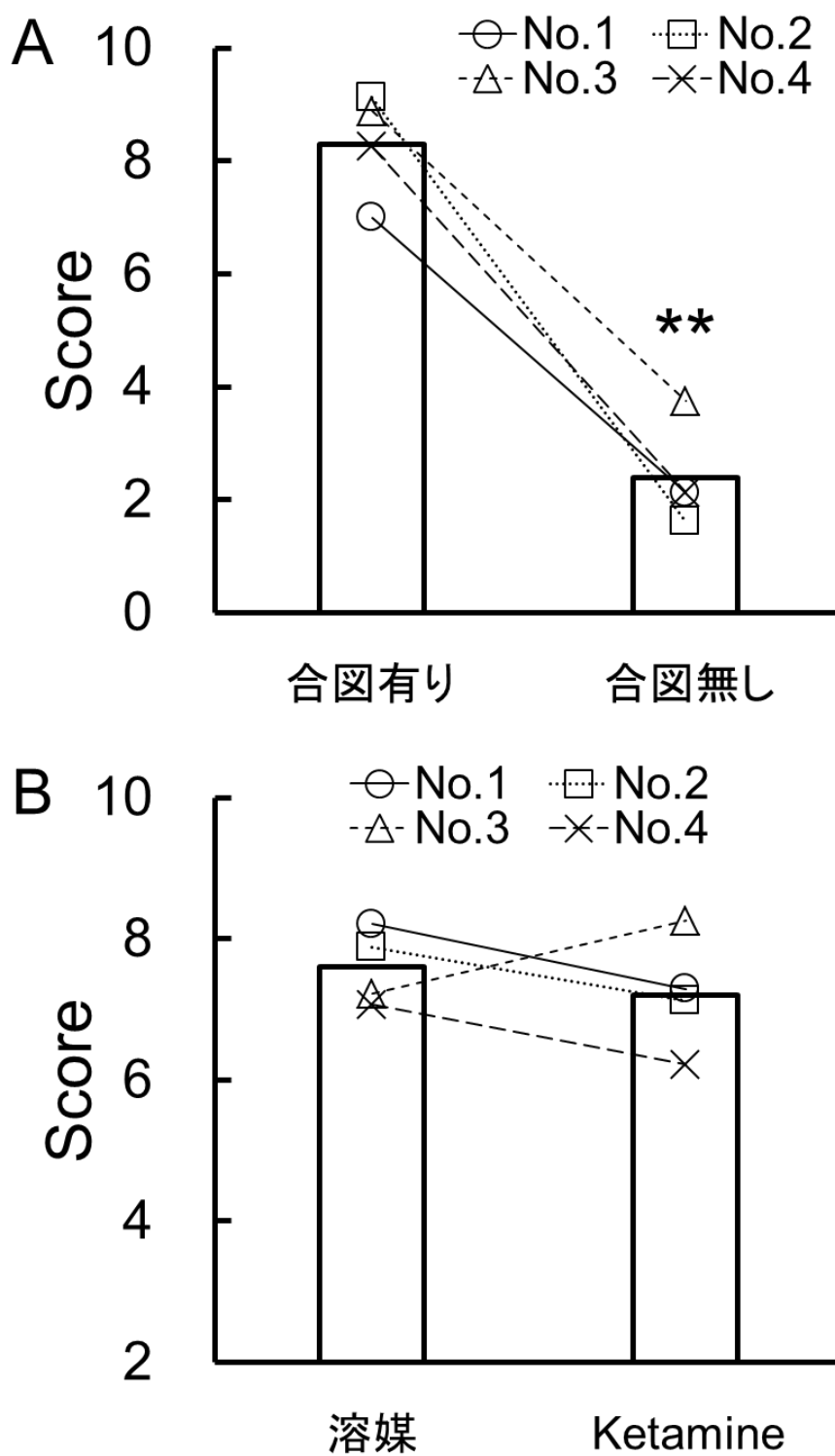


図 36
電球の点灯を合図としたときの成績。(A) 合図提示の有無の違いによる成績の変化。(B) 電球装着型装置を用いた ketamine の作用検討(n = 4 per marmoset). ** $P < 0.01$ (paired t-test).

(4) その他

RJA は IJA とともに ASD の診断に使用されており、RJA の異常は就学前には認められなくなるものの[78,79]、RJA も生後 18-24 か月までの児童においては ASD の診断法として有用であると考えられている[95, 96]。本章ではマーモセットが IJA を実施可能であるか不明であったため、著者は RJA を模倣した評価法を開発した。一方で、著者が用いたマーモセットは比較的高齢であり乳幼児に相当する年齢ではないため、JVA 試験に用いるには好ましくない可能性も考えられる。しかしながら、これまでに報告されている NHP を用いた JVA 試験とは異なり、著者が焦点を当てているのは薬剤誘発の JVA 障害であり、本章における障害は自然発症によるものではないことから、本試験で作製した病態モデルは不適切ではないと考えられる。また、健常児と ASD 児において RJA の成績に有意差が認められるものの、IJA における成績の差と比較すると非常に小さい[78,79]。この結果は、本章において ketamine による JVA スコアの低下幅が、有意ではあるものの小さかったという結果と関係しているかもしれない。

著者は、JVA 機能障害を誘発するために NMDA 受容体阻害薬である ketamine を使用した。Ketamine は麻酔薬としても使用されることから、第 2 章と同様に、可能な限り麻酔作用による影響を排除する必要があった。そのため、本章では 5 分以内に 1 セッションを完遂できるような ketamine の最大用量を探索し、それを各個体の最適用量として以降の試験に用いた。ketamine 投与により動作が緩慢になったが、電球を合図として使用した際に、ketamine による有意なスコアの低下は認められなかったことから、ketamine により惹起された動作緩慢はスコアに影響を及ぼさなかったと考えられる。Ketamine 用量の決定後、予備的に JVA スコアに及ぼす作用について複数回評価を実施したところ、各セッションにおけるスコアは必ずしも一定ではなかったため、著者は ketamine 投与を伴う群の評価を少なくとも 4 回ずつ実施し、それらを平均化することで薬剤の作用を評価することとした。被験物質の作用を評価し終えるまでに時間を要するが、JVA 機能の実行は PFC の賦活化と関連しており[82, 83]、またマーモセットは高度に発達した PFC を有していることから、本試験における ketamine 誘発 JVA 機能障害モデルは構成概念妥当性を有する病態モデルであると考えられる。

(5) 作用メカニズム

Lurasidone は D_2 受容体や 5-HT_{2A} 受容体だけでなく、 5-HT_7 受容体や 5-HT_{1A} 受容体にも高い結合親和性を有していることが特長であるが (図 37) [97]、これまでにラットにおいて ketamine 誘発社会的相互性障害が 5-HT_7 受容体拮抗薬により改善することが報告されていることから[98]、本章における lurasidone の改善作用も、 5-HT_7 受容体拮抗作用を介している可能性が考えられる。また、バルプロ酸を投与された妊娠ラットから出生した仔に認められる社会的相互性障害は、 5-HT_{1A} 受容体作動薬により改善するということが報告されていることから[99]、lurasidone が有する 5-HT_{1A} 受容体作動性も、JVA 障害に対する改善作用に寄与している可能性が示唆される。しかしながら、lurasidone の作用メカニズムを明らかにするには更なる検証が必要である。

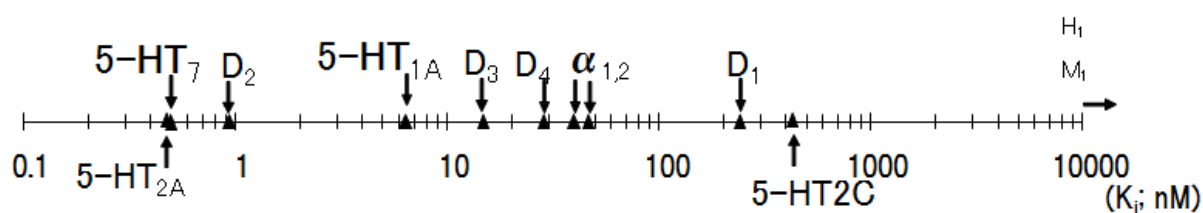


図 37 Lurasidone の受容体親和性プロファイル

(6) 小括

以上、本章ではヒトや他の NHP と同様にマーモセットも JVA 機能を有していることが示唆された。さらに、ketamine は JVA 機能を特異的に障害することが示唆され、lurasidone がその障害を改善することを明らかにした。マーモセットが JVA を実施できること、およびマーモセットに限らず NHP を用いた JVA 障害モデルを作製した報告はこれが初めてである。Ketamine を投与されたマーモセットにおいて、JVA 機能の異常という ASD 児と類似した行動が認められたこと、およびマーモセットは PFC が発達した動物種であることから、本章における ketamine 誘発 JVA 機能障害モデルは、表面および構成概念妥当性を有する ASD 病態モデルとなる可能性が示唆された。

総括

本研究において著者は、中枢神経系疾患治療薬の創製に向けた評価系の構築と行動薬理学的研究を行い、以下の新知見を得た。

1. M_4 受容体選択的作動薬が、MAP 試験において xanomeline と同様に抗精神病様作用を示すことを明らかにした。また、 M_1/M_4 受容体選択的部分作動薬は、 M_4 受容体作動性が部分的であっても xanomeline と同様に抗精神病様作用を示すことを明らかにした。さらに、xanomeline において認められた既存薬誘発カタレプシーの増悪化は、 M_1/M_4 受容体選択的部分作動薬では M_4 受容体作動性を xanomeline と比較して部分的にしたことにより認められなかった可能性を示したとともに、 M_2/M_3 受容体作動性の乖離により嘔吐、流涎、および縮瞳といった副作用を回避、または軽減できた可能性を示した。
2. CANTAB に含まれる SWM 課題を用いてマーモセットの認知機能を評価した結果、ヒトおよび他の NHP と同様に、マーモセットにおいても ketamine により障害が惹起されることを明らかにした。さらに認知機能改善作用を有する可能性が示唆されている D_1 受容体作動薬が、マーモセットにおける同障害を改善することを明らかにした。
3. 著者が作製した、マーモセットの JVA 機能を測定するための装置を用いて、ヒトや他の NHP と同様にマーモセットも JVA 機能を有していることを明らかにした。さらに、ketamine は JVA 機能を特異的に障害することが示唆され、lurasidone がその障害を改善することを明らかにした。

以上、著者は M_1/M_4 受容体選択的部分作動薬が、既存抗精神病薬と併用できる画期的な新規作用機序の統合失調症治療薬になり得ること、およびマーモセットが認知機能障害や ASD といった疾患において、妥当性を有する病態モデルの作製に有用である可能性を示した。本研究の成果は、新しい治療薬が求められている中枢神経系疾患において、その開発を後押しする基礎的知見を提供するものである。

実験の部

第 1 章に関する実験手法

FLIPR experiments for muscarinic M₁₋₅ receptors

The calcium mobilization assays were performed in CHO cells with stable expression of human muscarinic M₁, M₂, M₃, M₄ or M₅ receptors using a FLIPR^{TETRA} System (Fluorometric Imaging Plate Reader: Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA). In the case of Gi-coupled receptors (M₂ and M₄), Gα16 proteins were also co-expressed to increase the sensitivity of calcium signaling. Briefly, cells were plated at 20,000 (M₂ and M₄) or 40,000 cells (M₁, M₃ and M₅) per well in 96-well plates and allowed to grow overnight at 37 °C. Once the cells became 80-100 % confluent, 100 μL loading buffer containing FLIPR Calcium 4 dye (Molecular Devices Co.) was added to each well and incubated at 37 °C for 60 min, according to manufacture's instructions. In order to determine the agonistic activities, 50 μL of the assay buffer containing test compounds was added to each well. And at the same time, the calcium response was monitored on the FLIPR^{TETRA}. Concentration-response curves of agonism on M₁₋₅ receptors were analyzed for each compound. Results were imported into Stat Preclinica (Takumi Information Technology Inc., Tokyo, Japan) where the curves were analyzed by non-linear curve fitting and the resulting EC₅₀ was calculated.

Animals

All animals were housed in a controlled environment (23 ± 2 °C, 55 ± 10% humidity) with a 12-h light/dark cycle (lights on at 8:00 AM). They had free access to food and water unless specified. All procedures related to housing conditions and care complied with the institutional guidelines of Sumitomo Dainippon Pharma's Drug Research Division. All procedures involving the use of animals were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Sumitomo Dainippon Pharma Drug Research Division.

Drugs

Compound 1 was dissolved in a small amount of 0.1N HCl and then diluted with saline. Xanomeline tartaric acid was dissolved in saline. Compound 2, risperidone and haloperidol were suspended in 0.5% methylcellulose.

Methamphetamine-induced hyperactivity in rats

Male Sprague-Dawley (SD) rats (Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan) were injected with methamphetamine (1 mg/kg i.p.), and individually moved to clear plastic cages. According to the methods of Ishibashi and co-workers,[97] locomotor activity was measured for 80 min from 10 min after the methamphetamine injection (Supermex ; Muromachi Kikai Co. Ltd., Tokyo, Japan). Compound 1 (1, 3, or 10 mg/kg s.c.), xanomeline (3, 10, or 30 mg/kg s.c.), or vehicle was injected 30 min before the methamphetamine injection. Compound 2 (1, 3, or 10 mg/kg p.o.) risperidone (0.6 mg/kg p.o.), or vehicle was administered 60 min before the methamphetamine injection.

Prepulse inhibition test in rats

A startle reflex measurement system (O'Hara & Co., Tokyo, Japan) was used to measure startle response and prepulse inhibition (PPI). A test session began by placing a male SD rat in a plastic cylinder where it was left undisturbed for 5 min. Each apparatus was encased in a sound-attenuated box. A piezoelectric unit attached to the platform transduced vibrations of the cylinder, caused by the animal's movements, into analog signals. These signals were then digitized and recorded by a computer. The acoustic startle response (ASR) was recorded for 140 ms (measuring the response every 1 ms) starting with the onset of the prepulse stimulus. Each session consisted of startle trials ("pulse-alone"; a 40-ms 120-dB broadband pulse) and prepulse trials ("prepulse-alone"; a 20-ms 86-dB broadband pulse, "prepulse + pulse"; a 20-ms prepulse followed by a 80-ms interstimulus interval, and a 40-ms 120-dB pulse). Prepulse intensities were 13, 17, and 21 dB above background (i.e., 78, 82, and 86 dB). A session consisted of a 5-min acclimation period with background noise-alone, three startle trials, then ten presentations of each trial type (pulse-alone, prepulse-alone and prepulse + pulse of each prepulse intensity) in pseudorandom order. Intertrial intervals averaged 17.5 s

(range: 10–25 s). Xanomeline (3, or 10 mg/kg s.c.), compound 1 (1, 3 or 10 mg/kg, s.c.) or vehicle was first injected and, 15 min later, apomorphine (0.5 mg/kg, s.c.) or vehicle was injected. PPI tests were performed 15 min after the second injection. The amount of PPI for each prepulse intensity was calculated as a percentage score: %PPI = 100 - $[(ASR \text{ for prepulse} + \text{pulse}) / (ASR \text{ for pulse-alone})] \times 100$, using the average of the ten presentations of each trial type. The magnitude of the startle response (ASR for pulse-alone) was calculated as the average of the last 10 pulse-alone trials.

Catalepsy test in rats

In the catalepsy test, the forepaws of male SD rats were placed on a stainless-steel bar, and the time spent for the animals to show a cataleptic posture, which was defined as an immobile posture while keeping both forelimbs on the bar, was consecutively measured three times with a maximum limit of 180 s. The maximum time among three measures in each rat was used for the analysis. Xanomeline (30 or 100 mg/kg s.c.), compound 1 (10 or 30 mg/kg s.c.) or vehicle was injected 45 min before the tests. Haloperidol (0.3 or 1 mg/kg p.o.), risperidone (10 or 30 mg/kg p.o.) or vehicle was administered 60 min before the tests.

Vomiting in monkey

Effects of xanomeline and compound 1 on the gastrointestinal tract were investigated in 3 conscious and unrestraint male cynomolgus monkeys. The vehicle, xanomeline, or compound 1 dissolved in the vehicle was subcutaneously administered and analyzed before administration and at 1, 2 and 4 hours after administration.

Salivation in mice

Male ddY mice were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg, i.p.). Salivation responses to compound 1 (10 and 30 mg/kg, s.c.) and xanomeline (3, 10 and 30 mg/kg, s.c.) were quantitated for 30 minutes by collecting saliva on filter paper. In brief, mice were placed face down on a slightly inclined surface, with the heads facing downwards to allow free flow of saliva. After the injection, a pre-weighed piece of circular filter paper (diameter, 125 mm) was placed immediately below the mouth area of each mouse. Fresh pieces of pre-weighed filter paper were added when it was fulfilled with saliva. Filter papers were weighed for the quantitation of saliva production.

Seizure and tremor in mice

Male ddY mice were individually isolated in clear acrylic cages (12 × 12 × 18 cm). Seizures and tremor were evaluated for 45 min after injection of xanomeline (100, or 300 mg/kg, s.c.) or compound 1 (10, 30, or 100 mg/kg, s.c.) according to the following observational method: (seizure) 0, no seizures; 1, forelimb clonus or head jerks; 2, clonic seizures; 3, tonic-clonic or tonic seizures; (tremor) 0, no tremor; 1, mild tremor; 2, moderate tremor; 3, severe tremor.

Statistical analysis

All data are expressed as means ± SEM. Statistical analysis was performed using Stat Preclinica (Takumi Information Technology Inc., Tokyo, Japan). A probability level of <0.05 was considered statistically significant. In behavioral tests, data were analyzed by unpaired t-test or Dunnett test.

第2章に関する実験手法

Animals

Five female adult common marmosets (*Callithrix jacchus*, 4–10 years old) obtained from CLEA Japan Inc. (Tokyo, Japan) were used in this study. The animals were housed in an air-conditioned room kept at a temperature of $28 \pm 2^\circ\text{C}$ and a humidity of $50 \pm 20\%$ under a 12:12 light/dark cycle (lights off at 19:00). Food (CMS-1M, CLEA Japan, Inc.) was administered once daily, and water was available ad libitum. After the end of final experiments, animals were used in other evaluation. All experimental procedures involving animals were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Sumitomo Dainippon Pharma, Co.Ltd.

Training the marmosets to use a touchscreen so that they could complete the CANTAB SWM test

The marmosets were moved to the testing room during the test. So that the marmosets would begin to associate touching the touchscreen with getting a reward, we subjected them to a task in which they got a reward (a piece of kneaded cake, about 0.5 cm³) when they touched any part of the screen. As a next step, a yellow circle was displayed, and the marmosets were given a reward when they touched the circle. This task, which consisted of 10 trials, was conducted two or three times a week until the marmosets were able to complete it perfectly within 15 min.

CANTAB SWM test training

When the marmosets had achieved a suitable degree of competence in the initial training task, they were trained in the SWM test. In this task, 2 or 3 blue squares were displayed on the touchscreen. When a marmoset touched each of the squares in turn without touching any of the previously displayed squares, the trial was considered a success. In each trial, it did not matter which of the squares was touched first. Each square immediately disappeared after it had been touched and then reappeared after a few seconds (the vanishing period). The training for this task consisted of two steps. First, they were trained in the 2-square task using a vanishing period of 5 s. When the marmosets were able to successfully execute the training task in more than 10 out of 20

trials, the vanishing period was reduced to 3 s. Eventually, as their success rate increased, the vanishing period was reduced to 1 s. Then, when they had mastered the 2-square task, we started training them in the 3-square task. After performing 10 trials of the 2-square task, the marmosets were subjected to 20 trials of the 3-square task using a vanishing period of 5 s. The difficulty of the 3-square task was increased in the same manner as for the 2-square task until the marmosets were able to accurately and stably execute the task in more than 10 out of 20 trials. After that, we used the marmosets in the experiments outlined below. The training sessions were carried out twice a day, two or three times a week.

Determination of the optimal ketamine dose

Ketamine was intramuscularly injected into the marmosets at a dose of 1 mg/kg, and 30 min later, we conducted 10 trials of the 1-circle task, in which the marmosets had to touch a yellow circle that appeared on the screen. The 10 trials had to be completed within 15 min for the task to be deemed a success. When a marmoset was able to successfully complete the task, we subjected them to the same test at a higher ketamine dose a week later. We repeated this procedure until they could not execute the task perfectly. The highest dose at which each marmoset was able to complete the task perfectly was regarded as the optimal subanesthetic dosage for that animal and was used in the subsequent experiments.

Testing the effect of a dopamine D1 receptor agonist

The test schedule for this part of the experiment consisted of 4 sessions: the 1st vehicle, ketamine, 2nd vehicle, and D1 agonist + ketamine sessions, and the sessions were implemented 5–6 times in turn in each marmoset. The drug-free test sessions (the 1st and 2nd vehicle sessions) were performed 1–7 day(s) before the drug-challenge sessions, and the drug administration sessions were separated by a period of at least 5 days. The effect of ketamine was compared with that of vehicle. The dopamine D1 receptor agonist SKF-81297 (3 or 10 mg/kg) or nothing was orally administered to the marmosets 60 min before the SWM test. Thirty minutes later, the marmosets were intramuscularly injected with ketamine or vehicle. The SWM test included 10 trials of

the 2-square task and 20 trials of the 3-square task using a vanishing period of 1 s. The success rate and percentage accuracy of each task were calculated by dividing the number of correct trial(s) by the total number of trials or response-positive trial(s), respectively. When a marmoset did not touch the screen at all during a task (i.e., all of the trials were scored as omissions), the results for the other two sessions performed by that animal were not used to calculate percentage accuracy. For example, if a marmoset did not touch the screen at all in the 2-square task when administered SKF-81297 and ketamine, the corresponding 2-square task results for the 1st vehicle and ketamine sessions were also excluded.

例)

	前半	後半
1週目	溶媒	Ketamine
2週目	溶媒	SKF + Ketamine
3週目	試験なし(休薬)	

1セット

Drugs

Ketamine (Daiichi Sankyo, Tokyo) was formulated with sterile saline, and the D1 full agonist SKF-81297; i.e., (\pm)-6-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-1-phenyl-1H-3-benzazepine hydrobromide (Tocris Bioscience, Ellisville, MO), was suspended in 0.5% methylcellulose. The ketamine and SKF-81297 were administered in a total volume of 0.5 ml/kg and 5 ml/kg, respectively.

Statistical analysis

All data are expressed as means \pm SEM. Differences between groups were determined using the paired or Student's t-test. A probability level of <0.05 was considered statistically significant.

第3章に関する実験手法

1. Animals

Two male and three female adult common marmosets (*Callithrix jacchus*, 5–7 years old) obtained from CLEA Japan Inc. (Tokyo, Japan) were used in this study. The animals were housed in an air-conditioned room maintained at a temperature of $28 \pm 2^\circ\text{C}$ and a humidity of $50 \pm 20\%$ under a 12/12, light/dark cycle (lights off at 19:00). Food (CMS-1M, CLEA Japan, Inc.) was administered once daily, and water was available ad libitum. After all experiments for this study were complete, the animals were used in other experiments. All experimental procedures involving animals were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Sumitomo Dainippon Pharma, Co., Ltd.

2. JVA task

2.1. Apparatus and procedure

The apparatus was constructed using 4 white-colored acrylic boxes ($4 \times 4 \times 4$ cm, each box was numbered), which were attached to the 4 corners of a square frame (10×10 cm). All of the boxes had a door with a hinge (Fig. 30) and the marmosets could easily obtain a food reward (a piece of kneaded cake, about 0.5 cm^3) by pushing the door forward. All experiments were conducted in the animals' home cages, and all doors and inside surfaces of the boxes were wiped down when one session was finished. An experimenter stood in front of the marmoset's home cage with the apparatus facing the marmoset. Subsequently, the experimenter moved the apparatus closer to the marmoset, and informed the animal which box had the reward by pointing and gazing toward the box. We scored the marmosets' JVA ability using the following conditions: 10, obtained the rewards without any mistakes; 3, obtained the rewards with only one mistake; 1, two mistakes; or 0, more than three mistakes. When the marmosets sequentially opened the same door more than twice, it was counted as once. The cues were repeated until the subject obtained the reward or made more than three mistakes in each trial. The marmosets performed 8 cued trials, and each box was used twice during a single session. Thereafter, the total score was averaged.

2.2. Training

Marmosets underwent training sessions until they reached a constant level of success. First, we trained marmosets to understand that there is a reward behind the doors. We turned the apparatus toward the marmosets with the doors opened. Next, we taught the marmosets to understand that they could obtain a reward when they opened the door spontaneously. We altered the apparatus by closing the doors and adding rewards to all of the boxes, and the monkeys performed the task without cues.

2.3. Testing the effects of cues

Marmosets performed 8 trials with cues (pointing gesture and gaze), as mentioned above. Subsequently, they performed 8 more trials without the cues using the same apparatus and order.

2.4. Determination of the optimal ketamine dose

The dosage of ketamine was determined as follows. First, ketamine was intramuscularly injected into the marmosets at a dose of 1 mg/kg, and 30 min later, we conducted 8 trials. The 8 trials had to be completed within 5 min. When the marmosets were able to complete the task, they performed the same test at a higher ketamine dose a week later. We repeated this procedure until they could no longer execute the task within the 5-min limit. The highest dose at which each marmoset was able to complete the task was regarded as the optimal subanesthetic dosage for that animal and was used in the subsequent experiments.

2.5. Evaluating the effect of lurasidone on ketamine-induced JVA impairment

The evaluation was conducted twice a week, but not on the same day. When we administered vehicle/vehicle in the first experiment, the next administration in the second experiment was vehicle/ketamine or lurasidone/ketamine and vice versa. The next week after the 2-week experiment was a washout period, i.e., we conducted the 2-week experiments every 3 weeks. Lurasidone (10 mg/kg) or vehicle was orally administered 60 min before the JVA task. Thirty minutes later, the marmosets were

intramuscularly injected with ketamine or vehicle. When the marmoset could not finish the task within 5 min, the results from this evaluation and from the evaluation conducted earlier that same week were both excluded from analysis. The evaluation of vehicle/ketamine and lurasidone/ketamine dosages was conducted 4–6 times per marmoset, respectively, and we calculated the average score. The individuals that did the drug administration were different from those who did the evaluation, and their roles did not change throughout the course of this study. Moreover, the investigator was blinded to which treatment was given to the marmosets. The order of drug administration was counterbalanced such that the number of times that vehicle/vehicle was administered in the first and second experiment and vehicle/ketamine or lurasidone/ketamine was administered in the first and second week were equal.

例)

	前半	後半
1週目	溶媒	Ketamine
2週目	ルラシドン+ketamine	溶媒
3週目	試験なし	
4週目	溶媒	ルラシドン+ketamine
5週目	溶媒	Ketamine
6週目	試験なし	

1セット

2.6. Evaluating the effect of lurasidone on JVA function with naïve marmosets

This procedure was similar to what was described in Section 2.5. We administered vehicle in the first experiment so that the administration in the second experiment was lurasidone and vice versa, with no washout period. Lurasidone (10 mg/kg) or vehicle was orally administered 60 min before the JVA task. The evaluation of vehicle and lurasidone dosages was conducted four times per marmoset in a blinded manner, and we then calculated the averagescore.

3. Light-cued task

3.1. Apparatus and procedure

The same colored lights (yellow or red) were mounted on each box and were used as cues instead of a pointing gesture and gaze. The procedure was the same as that described in Section 2.1.

3.2. Training

Marmosets were only trained on the final stage because they were already familiar with the apparatus. We trained marmosets to understand that only the lighted box contained a reward.

3.3. Testing the effects of the light cue

As described in Section 2.3, the marmosets performed 8 trials with the light cue. Subsequently, they performed 8 more trials without the cue using the same apparatus and order.

3.4. Evaluating the effect of ketamine when using a light-mounted apparatus

The experimental conditions, dosages of ketamine, and time limit were the same as those described in Section 2.5. When we administered vehicle/vehicle in the first experiment, the next administration was vehicle/ketamine in the second administration and vice versa. The evaluation of vehicle/ketamine was conducted 4 times per marmoset in a blind manner, and we calculated the average score.

4. Drugs

Lurasidone was prepared at our laboratories and suspended in 0.5% methylcellulose. Ketamine (Daiichi Sankyo, Tokyo) was formulated with sterile saline. Lurasidone and ketamine were administered in a total volume of 5 mL/kg and 0.5 mL/kg, respectively.

5. Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm the standard error of the mean (SEM). Differences between groups were determined using paired t-tests. A probability level of <0.05 was considered statistically significant.

謝辞

本研究に際し、終始ご懇切なご指導を賜りました関西大学化学生命工学部長岡康夫教授に深甚なる敬意を表します。

本論文の作成にあたり、ご高閲を賜りました関西大学化学生命工学部上里新一教授、福永健治教授、下家浩二准教授、住吉孝明准教授に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、度重なるご助言とご協力を頂きました大日本住友製薬株式会社 先端創薬研究所長 石山健夫博士、創薬開発研究所 池田和仁博士、池尻勝様、榎本健史博士、村井建之博士、ゲノム科学研究所 酒井睦子様、京都大学霊長類研究所 中村克樹教授をはじめとする皆様に心から感謝の意を表します。

最後に本研究を遂行する機会を与えてくださり、また終始ご理解とご激励を賜りました大日本住友製薬株式会社 研究本部長 野口浩博士、創薬開発研究所長 志水勇夫博士、研究本部 泰地睦夫博士、中平博之博士に厚く御礼申し上げます。

発表論文目録

本研究内容は以下の論文に公表した。

1. Sumiyoshi T, Enomoto T, Takai K, Takahashi Y, Konishi Y, Uruno Y, Tojo K, Suwa A, Matsuda H, Nakako T, Sakai M, Kitamura A, Uematsu Y, and Kiyoshi A. Discovery of novel N-Substituted oxindoles as selective M₁ and M₄ muscarinic acetylcholine receptors partial agonists. *ACS Med Chem. Lett.* 2013;27;4(2):244–8.
2. Nakako T, Murai T, Ikejiri M, Ishiyama T, Taiji M, Ikeda K. Effects of a dopamine D₁ agonist on ketamine-induced spatial working memory dysfunction in common marmosets. *Behav Brain Res.* 2013;249:109–15.
3. Suwa A, Konishi Y, Uruno Y, Takai K, Nakako T, Sakai M, Enomoto T, Ochi Y, Matsuda H, Kitamura A, Uematsu Y, Kiyoshi A, Sumiyoshi T. Discovery of N-sulfonyl-7-azaindoline derivatives as potent, orally available and selective M₄ muscarinic acetylcholine receptor agonists. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(13):2909–12.
4. Nakako T, Murai T, Ikejiri M, Hashimoto T, Kotani M, Matsumoto K, Manabe S, Ogi Y, Ikeda K. Effects of lurasidone on ketamine-induced joint visual attention dysfunction as a possible disease model of autism spectrum disorders in common marmosets. *Behav Brain Res.* 2014;274:349–54.

引用文献

1. Andreasen NC, Flaum M, Swayze VW, Tyrrell G, Arndt S. Positive and negative symptoms in schizophrenia. A critical reappraisal. *Arch Gen Psychiatry* 1990;47(7): 615–21.
2. Meltzer HY. Treatment of schizophrenia and spectrum disorders: pharmacotherapy, psychosocial treatments, and neurotransmitter interactions. *Biol Psychiatry* 1999; 46(10):1321–7.
3. Casey DE. Extrapyramidal syndromes and new antipsychotic drugs: findings in patients and non-human primate models. *Br J Psychiatry Suppl* 1996;(29):32–9.
4. Hirsch S, Barnes TRE. The clinical treatment of schizophrenia with antipsychotic medication. In *Schizophrenia.*; Hirsch SR, Weinberger DR, Eds; 1995;Blackwell Science, Oxford.
5. Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998;50(2): 279–90.
6. Eglen RM. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem* 2005;43:105–36.
7. Eglen RM. Overview of muscarinic receptor subtypes. *Handb Exp Pharmacol* 2012;(208):3–28.
8. Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:633–73.
9. Wess J, Eglen RM, Gautam D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6(9): 721–33.
10. Raedler TJ, Knable MB, Jones DW, Urbina RA, Gorey JG, Lee KS, Egan MF, Coppola R, Weinberger DR. In vivo determination of muscarinic acetylcholine receptor availability in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2003;160(1):118–27.
11. Crook JM, Tomaskovic-Crook E, Copolov DL, Dean B. Decreased muscarinic receptor binding in subjects with schizophrenia: a study of the human hippocampal formation. *Biol Psychiatry* 2000;48(5):381–8.

12. Dean B, McLeod M, Keriakous D, McKenzie J, Scarr E. Decreased muscarinic1 receptors in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2002;7(10):1083–91.
13. Zavitsanou K, Katsifis A, Mattner F, Huang XF. Investigation of m1/m4 muscarinic receptors in the anterior cingulate cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression disorder. *Neuropsychopharmacology* 2004;29(3):619–25.
14. Scarr E, Sundram S, Keriakous D, Dean B. Altered hippocampal muscarinic M₄, but not M₁, receptor expression from subjects with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2007;61(10):1161–70.
15. Bubser M, Byun N, Wood MR, Jones CK. Muscarinic receptor pharmacology and circuitry for the modulation of cognition. *Handb Exp Pharmacol* 2012;(208): 121–66.
16. Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M₁ muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci* 2001;21(14):5239–50.
17. Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnema NP, Nathanson NM, Silva AJ. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M₁ muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci* 2003;6(1):51–8.
18. Bartko SJ, Romberg C, White B, Wess J, Bussey TJ, Saksida LM. Intact attentional processing but abnormal responding in M₁ muscarinic receptor-deficient mice using an automated touchscreen method. *Neuropharmacology* 2011;61(8):1366–78.
19. Keefe RSE Working memory dysfunction and its relevance to schizophrenia. In: Sharma T, Harvey P, editors. *Cognition in schizophrenia*. Oxford university press 2000;16–50.
20. Chudasama Y, Robbins TW. Functions of frontostriatal systems in cognition: comparative neuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans. *Biol Psychol* 2006;73(1):19–38.
21. Gerber DJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Huang SY, Caron MG, Tonegawa S. Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M₁ muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;18;98(26):15312–7.

22. Gomeza J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, Wess J. Enhancement of D₁ dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M₄ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(18):10483–8.
23. Koshimizu H, Leiter LM, Miyakawa T. M₄ muscarinic receptor knockout mice display abnormal social behavior and decreased prepulse inhibition. *Mol Brain* 2012;5:10.
24. Tzavara ET, Bymaster FP, Davis RJ, Wade MR, Perry KW, Wess J, McKinzie DL, Felder C, Nomikos GG. M₄ muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related CNS pathologies. *FASEB J* 2004;18(12):1410–2.
25. Fisher A, Pittel Z, Haring R, Bar-Ner N, Kliger-Spatz M, Natan N, Egozi I, Sonogo H, Marcovitch I, Brandeis R. M₁ muscarinic agonists can modulate some of the hallmarks in Alzheimer's disease: implications in future therapy. *J Mol Neurosci* 2003;20(3):349–56.
26. McArthur RA, Gray J, Schreiber R. Cognitive effects of muscarinic M₁ functional agonists in non-human primates and clinical trials. *Curr Opin Investig Drugs* 2010;11(7):740–60.
27. Bodick NC, Offen WW, Levey AI, Cutler NR, Gauthier SG, Satlin A, Shannon HE, Tollefson GD, Rasmussen K, Bymaster FP, Hurley DJ, Potter WZ, Paul SM. Effects of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1997;54(4):465–73.
28. Shekhar A, Potter WZ, Lightfoot J, Lienemann J, Dubé S, Mallinckrodt C, Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC. Selective muscarinic receptor agonist xanomeline as a novel treatment approach for schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2008;165(8):1033–9.
29. Bolbecker AR, Shekhar A. Muscarinic agonists and antagonists in schizophrenia: recent therapeutic advances and future directions. *Handb Exp Pharmacol* 2012; (208):167–90.
30. Shannon HE, Hart JC, Bymaster FP, Calligaro DO, DeLapp NW, Mitch CH, Ward JS, Fink-Jensen A, Sauerberg P, Jeppesen L, Sheardown MJ, Swedberg MD.

- Muscarinic receptor agonists, like dopamine receptor antagonist antipsychotics, inhibit conditioned avoidance response in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290(2):901–7.
31. Shannon HE, Rasmussen K, Bymaster FP, Hart JC, Peters SC, Swedberg MD, Jeppesen L, Sheardown MJ, Sauerberg P, Fink-Jensen A. Xanomeline, an M₁/M₄ preferring muscarinic cholinergic receptor agonist, produces antipsychotic-like activity in rats and mice. *Schizophr Res* 2000;42(3):249–59.
 32. Stanhope KJ, Mirza NR, Bickerdike MJ, Bright JL, Harrington NR, Hesselink MB, Kennett GA, Lightowler S, Sheardown MJ, Syed R, Upton RL, Wadsworth G, Weiss SM, Wyatt A. The muscarinic receptor agonist xanomeline has an antipsychotic-like profile in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299(2):782–92.
 33. Woolley ML, Carter HJ, Gartlon JE, Watson JM, Dawson LA. Attenuation of amphetamine-induced activity by the non-selective muscarinic receptor agonist, xanomeline, is absent in muscarinic M₄ receptor knockout mice and attenuated in muscarinic M₁ receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 2009;603(1-3):147–9.
 34. Dencker D, Wörtwein G, Weikop P, Jeon J, Thomsen M, Sager TN, Mørk A, Woldbye DP, Wess J, Fink-Jensen A. Involvement of a subpopulation of neuronal M₄ muscarinic acetylcholine receptors in the antipsychotic-like effects of the M₁/M₄ preferring muscarinic receptor agonist xanomeline. *J Neurosci* 2011; 31(16):5905–8.
 35. George M. Brenner, and Craig Stevens. *Pharmacology*, 4th Edition. Saunders. 2013
 36. Bymaster FP, Carter PA, Yamada M, Gomeza J, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, McKinzie DL, Felder CC. Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. *Eur J Neurosci* 2003;17(7):1403–10.
 37. Fink-Jensen A, Schmidt LS, Dencker D, Schülein C, Wess J, Wörtwein G, Woldbye DP. Antipsychotic-induced catalepsy is attenuated in mice lacking the M₄ muscarinic acetylcholine receptor. *Eur J Pharmacol* 2011;656(1-3):39–44.
 38. Green MF, Nuechterlein KH, Gold JM, Barch DM, Cohen J, Essock S, et al. Approaching a consensus cognitive battery for clinical trials in schizophrenia: the NIMH-MATRICES conference to select cognitive domains and test criteria. *Biol Psychiatry* 2004;56:301–7.

39. Harvey PD, Green MF, Keefe RS, Velligan DI. Cognitive functioning in schizophrenia: a consensus statement on its role in the definition and evaluation of effective treatments for the illness. *J Clin Psychiatry* 2004;65:361–72.
40. Grayson B, Idris NF, Neill JC. Atypical antipsychotics attenuate a sub-chronic PCP-induced cognitive deficit in the novel object recognition task in the rat. *Behav Brain Res* 2007;184:31–8.
41. Mutlu O, Ulak G, Celikyurt IK, Akar FY, Erden F, Tanyeri P. Effects of olanzapine, sertindole and clozapine on MK-801 induced visual memory deficits in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;99:557–65.
42. Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 2003;146:3–17.
43. Elston GN. Cortex, cognition and the cell: new insights into the pyramidal neuron and prefrontal function. *Cereb Cortex*. 2003;13(11):1124–38.
44. Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1991;148:1301–8.
45. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, et al. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 1994; 51:199–214.
46. Callicott JH, Bertolino A, Mattay VS, Langheim FJ, Duyn J, Coppola R, et al. Physiological dysfunction of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia revisited. *Cereb Cortex* 2000;10:1078–92.
47. Mendrek A, Laurens KR, Kiehl KA, Ngan ET, Stip E, Liddle PF. Changes in distributed neural circuitry function in patients with first-episode schizophrenia. *Br J Psychiatry* 2004;185:205–14.
48. Adler CM, Goldberg TE, Malhotra AK, Pickar D, Breier A. Effects of ketamine on thought disorder, working memory, and semantic memory in healthy volunteers. *Biol Psychiatry* 1998;43:811–6.
49. Buffalo EA, Gillam MP, Allen RR, Paule MG. Acute behavioral effects of MK-801 in rhesus monkeys: Assessment using an operant test battery. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;48:935–40.
50. Buccafusco JJ, Terry AV Jr. A reversible model of the cognitive impairment

- associated with schizophrenia in monkeys: potential therapeutic effects of two nicotinic acetylcholine receptor agonists. *Biochem Pharmacol* 2009;78:852–62.
51. Elsworth JD, Groman SM, Jentsch JD, Valles R, Shahid M, Wong E, et al. Asepinone effects on cognitive and monoamine dysfunction elicited by subchronic phencyclidine administration. *Neuropharmacology* 2012;62:1442–52.
 52. Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Tomioka I, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito M, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*. 2009;459(7246):523–7.
 53. Kishi N, Sato K, Sasaki E, Okano H. Common marmoset as a new model animal for neuroscience research and genome editing technology. *Dev Growth Differ* 2014;56(1):53–62.
 54. Levaux MN, Potvin S, Sepehry AA, Sablier J, Mendrek A, Stip E. Computerized assessment of cognition in schizophrenia: Promises and pitfalls of CANTAB. *Eur Psychiatry* 2007;22:104–15.
 55. Hutton SB, Huddy V, Barnes TR, Robbins TW, Crawford TJ, Kennard C, et al. The relationship between antisaccades, smooth pursuit, and executive dysfunction in first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2004;56:553–9.
 56. Owen AM, Downes JJ, Sahakian BJ, Polkey CE, Robbins TW. Planning and spatial working memory following frontal lobe lesions in man. *Neuropsychologia* 1990;28:1021–34.
 57. Owen AM, Evans AC, Petrides M. Evidence for a Two-Stage Model of Spatial Working Memory Processing within the Lateral Frontal Cortex: A Positron Emission Tomography Study. *Cereb Cortex* 1996;6:31–8.
 58. Manes F, Sahakian B, Clark L, Rogers R, Antoun N, Aitken M, et al. Decision - making processes following damage to the prefrontal cortex. *Brain* 2002;125:624–39.
 59. Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS (1994) The role of D₁-dopamine receptor in working memory: local injections of dopamine antagonists into the prefrontal cortex of rhesus monkeys performing an oculomotor delayed-response task. *J*

Neurophysiol 71:515–528

60. Roberts BM, Seymour PA, Schmidt CJ, Williams GV, Castner SA. Amelioration of ketamine-induced working memory deficits by dopamine D₁ receptor agonists. *Psychopharmacology (Berl)* 2010;210:407–18.
61. Muller U, von Cramon DY, Pollmann S (1998) D₁- versus D₂-receptor modulation of visuospatial working memory in humans. *J Neurosci* 18:2720–2728
62. Pouget P, Wattiez N, Rivaud-Péchoix S, Gaymard B. Rapid development of tolerance to sub-anaesthetic dose of ketamine: an oculomotor study in macaque monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 2010;209:313–8.
63. Marek GJ, Behl B, Bernalov AY, Gross G, Lee Y, Schoemaker H. Glutamatergic (N-methyl-D-aspartate receptor) hypofrontality in schizophrenia: too little juice or a miswired brain? *Mol Pharmacol* 2010;77:317–26.
64. Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 1997;17:2921–7.
65. Lorrain DS, Baccei CS, Bristow LJ, Anderson JJ, Varney MA. Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience* 2003;117:697–706.
66. Lewis DA, Volk DW, Hashimoto T. Selective alterations in prefrontal cortical GABA neurotransmission in schizophrenia: a novel target for the treatment of working memory dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;174:143–50.
67. Paspalas CD, Goldman-Rakic PS. Presynaptic D₁ dopamine receptors in primate prefrontal cortex: target-specific expression in the glutamatergic synapse. *J Neurosci* 2005;25:1260–7.
68. Gao WJ, Krimer LS, Goldman-Rakic PS. Presynaptic regulation of recurrent excitation by D₁ receptors in prefrontal circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:295–300.
69. Seamans JK, Durstewitz D, Christie BR, Stevens CF, Sejnowski TJ. Dopamine D₁/D₅ receptor modulation of excitatory synaptic inputs to layer V prefrontal cortex neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:301–6.
70. Wetherby AM, Prutting CA. Profiles of communicative and cognitive-social

- abilities in autistic children. *J Speech Hear Res* 1984;27:364–77.
71. Mundy P, Sigman M, Ungerer J, Sherman T. Defining the social deficits of autism: The contribution of nonverbal communication measures. *J Child Psychol Psychiatry* 1986;27:657–69.
 72. Charman T. Why is joint attention a pivotal skill in autism? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358:315–24.
 73. Dawson G, Toth K, Abbott R, Osterling J, Munson J, Estes A, et al. Early social attention impairments in autism: Social orienting, joint attention, and attention in autism. *Dev Psychol* 2004;40:271–83.
 74. Toth K, Munson J, Meltzoff AN, Dawson G. Early predictors of communication development in young children with autism spectrum disorder: Joint attention, imitation, and toy play. *J Autism Dev Disord* 2006;36:993–1005.
 75. Delincolas EK, Young RL. Joint attention, language, social relating, and stereotypical behaviours in children with autistic disorder. *Autism* 2007;11:425–36.
 76. Scaife M, Bruner JS. The capacity for joint visual attention in the infant. *Nature* 1975;253:265–6.
 77. Butterworth G, Cochran E. Towards a mechanism of joint visual attention in human infancy. *Int J Behav Dev* 1980;3:253–72.
 78. Mundy P, Sigman M, Kasari C. Joint attention, developmental level, and symptom presentation in children with autism. *Dev Psychopathol* 1994;6:389–401.
 79. Mundy P, Sullivan L, Mastergeorge AM. A Parallel and Distributed Processing Model of Joint Attention, Social-Cognition and Autism. *Autism Res* 2009;2:2–21
 80. Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:80–9.
 81. Christensen J, Grønberg TK, Sørensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, Vestergaard M. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*. 2013;309(16):1696–703.
 82. Grossmann T, Johnson MH, Lloyd-Fox S, Blasi A, Deligianni F, Elwell C, et al. Early cortical specialization for face-to-face communication in human infants. *Proc R Soc B Biol Sci* 2008;275:2803–11.
 83. Grossmann T, Johnson MH. Selective prefrontal cortex responses to joint attention

- in early infancy. *Biol Lett* 2010;6:540–3.
84. Courchesne E, Mouton PR, Calhoun ME, Semendeferi K, Ahrens-Barbeau C, Hallet MJ, et al. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA* 2011;306:2001–10.
 85. Povinelli DJ, Eddy TJ. Specificity of gaze-following in young chimpanzees. *Br J Dev Psychol* 1997;15:213–22.
 86. Tomasello M, Hare B, Fogleman T. The ontogeny of gaze following in chimpanzees, Pan troglodytes, and rhesus macaques, Macaca mulatta. *Anim Behav* 2001;61:335–43.
 87. Kumashiro M, Ishibashi H, Uchiyama Y, Itakura S, Murata A, Iriki A. Natural imitation induced by joint attention in Japanese monkeys. *Int J Psychophysiol* 2003;50:81–99.
 88. Carlsson ML. Hypothesis: Is infantile autism a hypoglutamatergic disorder? Relevance of glutamate-serotonin interactions for pharmacotherapy. *J Neural Transm* 1998;105:525–35.
 89. Carlson GC. Glutamate receptor dysfunction and drug targets across models of autism spectrum disorders. *Pharmacol Biochem Behav* 2012;100:850–4.
 90. Gandal MJ, Anderson RL, Billingslea EN, Carlson GC, Roberts TP, Siegel SJ. Mice with reduced NMDA receptor expression: More consistent with autism than schizophrenia? *Genes Brain Behav* 2012;11:740–50.
 91. Burket JA, Benson AD, Tang AH, Deutsch SI. D-Cycloserine improves sociability in the BTBR T+ Itpr3tf/J mouse model of autism spectrum disorders with altered Ras/Raf/ERK1/2 signaling. *Brain Res Bull* 2013;96:62–70.
 92. Murai T, Nakako T, Ikejiri M, Ishiyama T, Taiji M, Ikeda K. Effects of lurasidone on executive function in common marmosets. *Behav Brain Res* 2013;246:125–31.
 93. Murai T, Nakako T, Ikeda K, Ikejiri M, Ishiyama T, Taiji M. Lack of dopamine D4 receptor affinity contributes to the procognitive effect of lurasidone. *Behav Brain Res* 2014;261:26–30.
 94. Huang M, Panos JJ, Kwon S, Oyamada Y, Rajagopal L, Meltzer HY. Comparative effect of lurasidone and blonanserin on cortical glutamate, dopamine, and acetylcholine efflux: Role of relative serotonin (5-HT)_{2A} and DA D₂ antagonism

- and 5-HT1A partial agonism. *J Neurochem* 2014;128(6):938–49.
95. Stone W, Coonrod E, Ousley C. Brief Report: Screening tool for autism in two year olds (STAT): Development and preliminary data. *J Autism Dev Disord* 2000;30:607–12.
 96. Lord C, Risi S, Lambrecht L, Cook EH Jr, Leventhal BL, DiLavore PC, et al. The Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic: A standard measure of social communication deficits associated with the spectrum of autism. *J Autism Dev Disord* 2000;30:205–23.
 97. Ishibashi T, Horisawa T, Tokuda K, Ishiyama T, Ogasa M, Tagashira R, et al. Pharmacological profile of lurasidone, a novel antipsychotic agent with potent 5-hydroxytryptamine 7 (5-HT7) and 5-HT1A receptor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;334:171–81.
 98. Nikiforuk A, Kos T, Fijał K, Hołuj M, Rafa D, Popik P. Effects of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB-269970 and amisulpride on ketamine-induced schizophrenia-like deficits in rats. *PLoS One* 2013;DOI: 10.1371/journal.pone.0066695.
 99. Wang CC, Lin HC, Chan YH, Gean PW, Yang YK, Chen PS. 5-HT1A-receptor agonist modified amygdala activity and amygdala-associated social behavior in a valproate-induced rat autism model. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013;16:2027–39.