

博士論文

アデノシン $A_{2A}$ 受容体拮抗薬の抗うつ作用に関する  
行動薬理学的研究

2015年1月

静岡県立大学  
大学院薬学研究科

山田 浩司

# 博士論文

アデノシン $A_{2A}$ 受容体拮抗薬の抗うつ作用に関する  
行動薬理学的研究

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究科  
博士論文である。

2015年1月

山田 浩司

**Behavioral pharmacological studies on  
antidepressant effects of adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists**

**January 2015**

**Koji Yamada**

# 目次

目次.....	1
略語表.....	3
序論.....	4
本論.....	9
第1章 イストラデフィリンの受容体プロファイルの評価.....	9
1.1 材料及び方法.....	11
1.1.1 被験薬.....	11
1.1.2 放射性リガンド結合アッセイ：アデノシン受容体及び輸送体.....	11
1.1.3 放射性リガンド結合アッセイ：アデノシン以外のリガンドに対する受容体、輸送体、及びチャンネル.....	12
1.1.4 モノアミン代謝に関与する酵素に対する酵素阻害アッセイ.....	13
1.1.5 アデノシンA <sub>2A</sub> 受容体に対する機能アッセイ.....	13
1.1.6 データの解析.....	14
1.1.6.1 放射性リガンド結合アッセイ.....	14
1.1.6.2 酵素阻害アッセイ.....	15
1.1.6.3 機能アッセイ.....	15
1.2 結果.....	16
1.2.1 アデノシン受容体／輸送体に対するイストラデフィリンの親和性.....	16
1.2.2 アデノシン以外の受容体／輸送体に対するイストラデフィリンの親和性.....	17
1.2.3 モノアミンの代謝に関与する酵素に対するイストラデフィリンの阻害作用.....	19
1.2.4 アデノシンA <sub>2A</sub> 受容体に対するイストラデフィリンの拮抗活性.....	20
1.3 考察.....	22
1.4 小括.....	24
第2章 強制水泳試験及び尾懸垂試験を用いたアデノシンA <sub>2A</sub> 受容体遮断による抗うつ作用の評価.....	25
2.1 材料及び方法.....	25
2.1.1 使用動物.....	25
2.1.2 使用薬剤.....	25
2.1.3 行動薬理学的評価.....	26
2.1.3.1 ラット強制水泳試験.....	26
2.1.3.2 マウス強制水泳試験.....	26
2.1.3.3 マウス尾懸垂試験.....	27
2.1.4 統計解析.....	27
2.2 結果.....	28
2.2.1 ラット強制水泳試験におけるイストラデフィリンの作用.....	28
2.2.2 ラット強制水泳試験におけるイストラデフィリンの作用に対するコルチコステロンの影響.....	29

2.2.3	マウス強制水泳試験におけるイストラデフィリンの作用 .....	32
2.2.4	マウス強制水泳試験におけるイストラデフィリンとベンラファキシンの併用効果.....	33
2.2.5	マウス尾懸垂試験におけるイストラデフィリンと種々の抗うつ作用を持つ薬剤との併用効果.....	34
2.3	考察.....	37
2.4	小括.....	40
<b>第 3 章 ラット学習性無力モデルを用いたアデノシンA<sub>2A</sub>受容体遮断による抗うつ作用の評価.....</b>		
3.1	材料及び方法.....	41
3.1.1	使用動物.....	41
3.1.2	使用薬剤.....	41
3.1.3	行動薬理学的評価.....	42
3.1.3.1	ラット学習性無力試験.....	42
3.1.3.2	薬剤の全身投与.....	43
3.1.3.3	薬剤の局所投与.....	44
3.1.4	統計学的解析.....	44
3.2	結果.....	45
3.2.1	イストラデフィリン又は抗うつ薬の、単回、若しくは、反復又は飲水投与の効果.....	45
3.2.2	ドパミン受容体作動薬又はアデノシン受容体拮抗薬処置の効果.....	47
3.2.3	側坐核に注入したアデノシン受容体作動薬がうつ様行動に与える影響.....	49
3.2.4	イストラデフィリンの抗うつ様作用に対するA <sub>2A</sub> 受容体作動薬の効果.....	50
3.2.5	セロトニン又はアドレナリン受容体拮抗薬がイストラデフィリンの抗うつ様作用に与える影響.....	52
3.3	考察.....	54
3.4	小括.....	57
<b>総括.....</b>		<b>58</b>
<b>結論.....</b>		<b>59</b>
<b>謝辞.....</b>		<b>61</b>
<b>参考文献.....</b>		<b>62</b>

## 略語表

5-HT	5-Hydroxytryptamine or serotonin
6-OHDA	6-hydroxydopamine
8-OH-DPAT	8-Hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin
ACTH	Adrenocorticotropic hormone
APA	American Psychiatric Association
cAMP	Adenosine 3'5'-cyclic monophosphate
$C_{max}$	Maximum concentration
COMT	Catechol- <i>O</i> -methyltransferase
CPu	Caudate-putamen
DSM	Diagnostic and statistical manual of mental disorders
EC <sub>50</sub>	50% effective concentration
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ER	Escape response
FR	Fixed ratio
FST	Forced swim test
GABA	$\gamma$ -Amino-butyrac acid
GPCR	G protein-coupled receptor
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal
IC <sub>50</sub>	50% inhibitory concentration
IES	Inescapable stress
IR	Intertrial response
$K_B$	Binding constant
$K_d$	Dissociation constant
$K_i$	Inhibition constant
LH	Learned helplessness
MAO	Monoamine oxidase
MED	Minimum effective dose
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MSN	Medium spiny neuron
NAc	Nucleus accumbens
NaSSA	Noradrenergic and specific serotonergic antidepressant
PDE	Phosphodiesterase
PET	Positron emission tomography
PVN	Paraventricular nucleus
SNRI	Serotonin norepinephrine reuptake inhibitor
SSRI	Selective serotonin reuptake inhibitor
TCA	Tricyclic antidepressant
TST	Tail suspension test

## 序論

### うつ病とその治療

気分障害は長期間持続する気分（感情）の変調により日常生活に何らかの支障をきたした状態のことであり、うつ病はこの気分障害に含まれる疾患である。アメリカ精神医学会（American Psychiatric Association; APA）が発行する精神疾患の診断・統計マニュアル第5版（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; DSM-5、2013年発行）によると、気分障害はうつ状態だけが続く「うつ病性障害」と、躁状態とうつ状態をくり返す「双極性障害」の主に2つのグループに分けられ、うつ病性障害は、更に、症状の程度や、症状が持続する期間によって大うつ病と気分変調性障害に分けられる。一般にはこの大うつ病が、うつ病と呼ばれる疾患である。また、抑うつ状態がありながらも、うつ病に典型的な症状の一部がみられないものは「非定型うつ病」と呼ばれ、近年、若者世代を中心に目立つようになっている（Figure 1）。

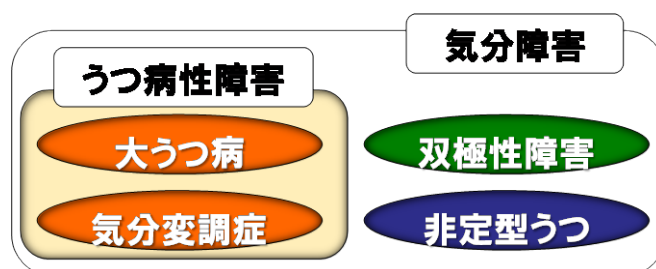


Figure 1. DSM-5における気分障害の分類

2002年の厚生労働省による調査では、本邦におけるうつ病の有病率は6.5%、生涯罹患率はおおよそ1/15人であると報告されている<sup>1)</sup>。しかし、患者数は年々増加しており1999年には44.1万人だったものが、2008年には104.1万人<sup>2)</sup>、2014年には111.6万人に達している<sup>3)</sup>。また、医師による治療を受けていないうつ病患者も多いことから<sup>1)</sup>、実際の患者数は更に多いと推察される。そして、ストレスの多い現代社会においてうつ病患者はますます増え続け、所謂「common disease」となっている。また、社会の中心的役割を果たすはずの世代が多く罹患す

ることから、先進国においては、うつ病はガンや認知症等にも匹敵する社会負担の大きい疾患とされている<sup>4)</sup>。

うつ病の治療法には主として、休養、精神療法（支持的精神療法及び認知療法等）及び薬物療法が挙げられる。このうち薬物療法では主として抗うつ薬が用いられ、病状によっては抗不安薬又は睡眠薬等が併用される。抗うつ薬は、化学構造の違いから「三環系（tricyclic antidepressant; TCA）」「非三環系」に分類され、更に非三環系は「選択的セロトニン再取り込み阻害薬（selective serotonin reuptake inhibitor; SSRI）」及び「セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬（serotonin noradrenaline reuptake inhibitor; SNRI）」等に分類される。Figure 2 には、セロトニン作動性神経やノルアドレナリン作動性神経等のモノアミン神経系の神経伝達の様子を模式化して表した。シナプス前膜から放出されたモノアミン類はシナプス後膜にある受容体に結合し情報を伝達するが、余剰のモノアミンは各々に特異的な輸送体を介してもとのシナプス前膜に再度取り込まれる。前述の三環系、SSRI及びSNRI等の代表的な抗うつ薬は輸送体サブタイプ間の選択性に相違はあるものの、基本的にはこの再取り込みを阻害しシナプス間隙におけるモノアミンを上昇させた結果、抗うつ作用を発揮すると考えられている。また、本邦ではほとんど使用されないものの、モノアミン代謝酵素であるモノアミン酸化酵素（monoamine oxidase; MAO）阻害剤等も抗うつ作用を持つことが知られており、更に「ノルアドレナリン作動性・特異的セロトニン作動性のメカニズムを持つ抗うつ薬（noradrenergic and specific serotonergic antidepressant; NaSSA）」も存在する。いずれにせよ、既存のほぼ全ての抗うつ薬の作用メカニズムはモノアミン神経伝達への作用に依存していることから、うつ症状及びその治療については、モノアミン神経系への作用を中心に議論されてきた<sup>5)</sup>。



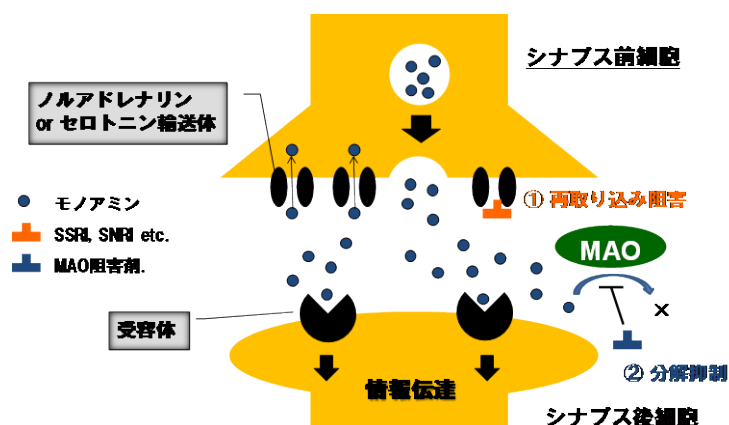


Figure 2. 既存抗うつ薬の作用メカニズム

### アデノシンA<sub>2A</sub>受容体とうつ症状

アデノシンは、神経伝達物質又は神経細胞モジュレーターとして多様な生理機能や病態に関与している<sup>6)</sup>。アデノシン受容体には4つのサブタイプ、すなわち、アデノシンに対して比較的高親和性のA<sub>1</sub>及びA<sub>2A</sub>受容体、並びに低親和性で分布密度の低いA<sub>2B</sub>及びA<sub>3</sub>受容体が知られている。このうち、A<sub>2A</sub>受容体は7回膜貫通型のGタンパク質共役受容体 (G-protein-coupled receptor; GPCR) であり、アデノシンとの結合により細胞内のサイクリックAMP (cAMP) を上昇させる<sup>7)</sup>。A<sub>2A</sub>受容体は末梢組織にも分布しているが、特に中枢神経系では大脳基底核経路を形成する線条体及び淡蒼球、更には、うつ・不安などの情動行動に重要な領域である側坐核にも高発現している<sup>8)</sup> (Table 1)。このような事実から、アデノシンA<sub>2A</sub>受容体がうつ症状の発現及びその制御に寄与していることが示唆される。

サブタイプ	共役タンパク質	cAMP*)	中枢における分布	末梢における分布
A <sub>1</sub>	G <sub>i1/2/3</sub> , G <sub>o</sub>	低下	広範囲に分布	広範囲に分布 (主に心臓、腎臓、肥満細胞)
A <sub>2A</sub>	G <sub>s</sub> , G <sub>olf</sub> , G <sub>15/16</sub>	上昇	線条体、淡蒼球 側坐核、嗅結節	血管 (平滑筋、内皮細胞) 好中球等の免疫細胞、血小板
A <sub>2B</sub>	G <sub>s</sub> , G <sub>q/11</sub>	上昇	広範囲に分布 (低密度)	広範囲に分布 (超低密度)
A <sub>3</sub>	G <sub>i2,3</sub> , G <sub>q/11</sub>	低下	広範囲に分布 (低密度)	広範囲に分布 (低密度)

\*) リガンド結合時の細胞内cAMP濃度の定性的な変化

Table 1. アデノシン受容体各サブタイプの特性

2001年El Yacoubiらは、げっ歯類における比較的一般的な抗うつ作用の評価系である尾懸垂試験 (tail suspension test; TST) 及び強制水泳試験 (forced swim test; FST) を用いて、A<sub>2A</sub>受容体ノックアウトマウスの表現型について報告している<sup>9)</sup>。動物の不動時間をうつ症状の指標とするこれらの2種類の評価系のいずれにおいても、A<sub>2A</sub>受容体ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して不動時間の短縮、すなわち、抗うつ症状様の表現型を示した<sup>9, 10)</sup>。従って、A<sub>2A</sub>受容体の遮断により、うつ症状が抑制されることが示唆される。

しかし、遺伝子欠損マウスでは発生期から継続的に全身のA<sub>2A</sub>受容体が完全に抑制されていることから、これらの動物を用いた解析は実際の病態とは異なった非生理的な条件下での評価である可能性が否定できない。そこで、本研究では、主としてアデノシンA<sub>2A</sub>受容体に作用する化合物を用いた薬理的な手法によって、A<sub>2A</sub>受容体とうつ症状の関係を検討した。また、評価系として、TST、FST、及び、学習性無力 (learned helplessness; LH) 試験等の、げっ歯類を用いた行動薬理的な方法を用いた。

各々の評価において、A<sub>2A</sub>受容体作動薬としてCGS21680、A<sub>2A</sub>受容体拮抗薬としてイストラデフィリンを主な評価ツールとして用いた。このうち、CGS21680は既に試薬として汎用されており、多くの報告からもその性状が明確な化合物である<sup>11)</sup>。一方で、イストラデフィリンは協和発酵キリン (株) で合成された新規化合物であり、その受容体プロファイルに関する情

報等が不足している。そこで、動物を用いた*in vivo*薬理試験に先立ち、その受容体プロフィール等を*in vitro*で詳細に解析した。

# 本論

## 第1章 イストラデフィリンの受容体プロファイルの評価

イストラデフィリン〔(E)-8-(3,4-dimethoxystyryl)-1,3-diethyl-7-methyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione、開発コードKW-6002〕は、1990年代に協和発酵工業（現、協和発酵キリン）において、アデノシンA<sub>2A</sub>受容体への親和性を指標にしたスクリーニングにより見出されたキサンチン誘導体の化合物である<sup>12)</sup>（Figure 3）。本化合物は、レセルピン又はハロペリドール等の薬剤によってマウス又はラットに誘導されるカタレプシー（他者から与えられた通常は耐えられない不自然な姿勢を長時間維持し続ける状態）及び自発運動量の低下を、単剤及び閾値用量のレボドパ（ドパミンの前駆体、パーキンソン病治療薬）との併用投与により明確に改善することが報告されている<sup>12)、13)</sup>。また、ドパミン神経毒である6-ヒドロキシドパミン（6-hydroxydopamine; 6-OHDA）で片側の黒質-線条体ドパミン神経を選択的に破壊したラットでは、レボドパ投与により破壊側と逆側に回転行動を示すことが知られているが、イストラデフィリンは、レボドパによって惹起される逆側回転行動の持続時間を延長させた<sup>14)</sup>。これらの行動薬理学的評価系は、げっ歯類を用いた代表的なパーキンソン病の病態モデルとされている。すなわち、イストラデフィリンは多様なげっ歯類パーキンソン病モデルにおいて運動異常を改善することが明らかになっている。

ドパミン神経毒である1-メチル-4フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; MPTP）を小型の霊長類であるマーモセットに投与すると、ドパミン神経が選択的に変性脱落すると同時に、筋固縮、無動、姿勢反射障害といったパーキンソン病患者に類似した運動症状が惹起されること等から、MPTP処置マーモセットはパーキンソン病の運動症状に対する臨床予測性に最も優れた病態モデル動物のひとつと考えられている<sup>15)</sup>。イストラデフィリンは本系においても、単剤及びレボドパとの併用投与で明確な抗パーキンソン病作用を示す<sup>16)、17)</sup>。

パーキンソン病患者では、ドパミン神経の変性脱落によりドパミンD<sub>2</sub>様受容体を介したドパミンの抑制性作用が減弱し、間接経路を形成する線条体から淡蒼球外節へ投射するγ-アミノ酪酸（γ-aminobutyric acid; GABA）作動性の中型有棘神経細胞（medium spiny neuron; MSN）の抑制性出力が増大した結果、大脳基底核回路の最終出力部位に対する直接経路と間接経路からの

入力のバランスが崩れ、運動機能が低下している<sup>18, 19)</sup>。イストラデフィリンは、線条体においてMSNに対するアデノシンの脱抑制性作用に拮抗して線条体-淡蒼球MSNの過剰な活性を抑制すると共に、淡蒼球においてはMSNの神経終末のアデノシンA<sub>2A</sub>受容体に結合することでアデノシンによるMSNからのGABA遊離の促進に拮抗する。イストラデフィリンはこの2つの作用によりMSNの活性を抑制し、直接経路と間接経路のバランスを正常な状態に近づけて運動機能を改善すると考えられている<sup>20, 21)</sup>。

このような理由から、イストラデフィリンはパーキンソン病を標的疾患として臨床開発がすすめられた。2006～2008年レボドパ製剤で治療中の運動合併症を併発しているパーキンソン病患者を対象にした国内Phase IIb試験が実施され、主要評価項目である最終評価時の1日平均オフ時間の観察期からの変化が、イストラデフィリン投与群において有意に短縮したことが報告された<sup>22)</sup>。2009～2012年に実施された国内Phase III試験でも同様の結果が得られ<sup>23)</sup>、その後、2013年国内医薬品製造販売の承認を受けた。そして、2013年5月30日、日本発、世界初のアデノシンA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬ノウリアスト<sup>®</sup>として発売されることとなった。

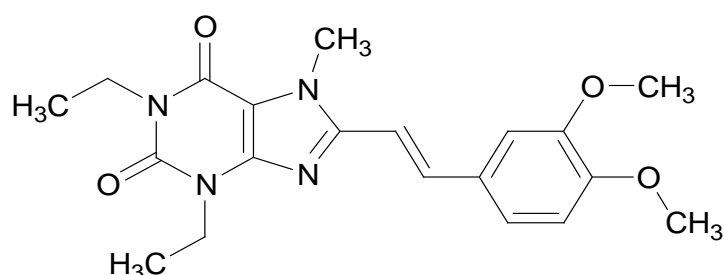


Figure 3. イストラデフィリンの構造

現在までに、キサンチン骨格以外にも多様なアデノシンA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬が見出されているが<sup>24)</sup>、イストラデフィリンを含めそれらの化合物の受容体サブタイプ間の選択性等の*in vitro*の作用プロファイルについては十分な情報がない。一方で、うつ症状に対するA<sub>2A</sub>受容体の関与を*in vivo*の薬理的評価によって明らかにするためには、そのツールとして選択的かつ強力な作動薬及び拮抗薬が必須である。そこで、まず、イストラデフィリンの*in vitro*作用プロファイルリングを実施し、本化合物が評価ツールとなり得るかを検証した。

## 1.1 材料及び方法

### 1.1.1 被験薬

イストラデフィリンは協和発酵キリン（株）で合成されたものを用いた。本化合物は光に対し不安定であったことから、全ての薬液調製及び試験は可能な限り低照度の条件下で実施した。

### 1.1.2 放射性リガンド結合アッセイ：アデノシン受容体及び輸送体

既報<sup>25)</sup>に従って試験を実施した。アデノシンA<sub>1</sub>受容体結合アッセイには、組換えヒト又はラットA<sub>1</sub>受容体を発現する培養細胞の膜画分、若しくは、マウス、イヌ又はマーモセットから採取した大脳の前脚皮の膜画分を用いた。アデノシンA<sub>2A</sub>受容体結合アッセイは、組換えヒト又はラットA<sub>2A</sub>受容体を発現する培養細胞の膜画分、若しくは、マウス、イヌ又はマーモセットから抽出した線条体の膜画分を用いた。アデノシンA<sub>2B</sub>受容体結合アッセイは、ヒト組換え受容体を発現する培養細胞の膜画分を用いた。アデノシンA<sub>3</sub>受容体結合アッセイは、組換えヒト又はラットA<sub>3</sub>受容体を発現する培養細胞の膜画分を用いた。アデノシン輸送体結合アッセイは、モルモットの全脳から調製した膜画分を用いた。

種々の濃度のイストラデフィリン及び放射性標識されたリガンドを膜画分に添加し、ラットA<sub>1</sub>受容体に対する結合アッセイは 4°C、それ以外は 25°Cで反応させた。反応時間は、ヒトA<sub>2B</sub>受容体の評価時は 30 分間、ヒトA<sub>1</sub>受容体、ラットA<sub>1</sub>受容体、ラットA<sub>2A</sub>受容体及びモルモットのアデノシン輸送体の評価時は 60 分間、マウスA<sub>1</sub>受容体、イヌA<sub>1</sub>受容体、マーモセットA<sub>1</sub>受容体及びヒトA<sub>2A</sub>受容体の評価時は 90 分間、マウスA<sub>2A</sub>受容体、イヌA<sub>2A</sub>受容体、マーモセットA<sub>2A</sub>受容体、ラットA<sub>3</sub>受容体及びヒトA<sub>3</sub>受容体の評価時は 120 分間とした。

トレーサーとして使用した各受容体又は輸送体に選択的なりガンドを以下に示す。マウス又はマーモセットA<sub>1</sub>受容体用：1 nmol/L [<sup>3</sup>H]-CHA (N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine、PerkinElmer Life & Analytical Sciences)。ラットA<sub>1</sub>受容体用：0.9 nmol/L [<sup>3</sup>H]-DPCPX (8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine、GE Healthcare Biosciences)。イヌA<sub>1</sub>受容体用：6 nmol/L [<sup>3</sup>H]-CHA。ヒトA<sub>1</sub>受容体用：2 nmol/L [<sup>3</sup>H]-DPCPX。マウス、イヌ又はマーモセットA<sub>2A</sub>受容体用：4 nmol/L [<sup>3</sup>H]-CGS21680 (2-[p-(2-carboxyethyl)phenethylamino]-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine、PerkinElmer Life & Analytical Sciences)。ラットA<sub>2A</sub>受容体用：6 nmol/L [<sup>3</sup>H]-CGS21680。ヒトA<sub>2A</sub>受容体用：10 nmol/L [<sup>3</sup>H]-CGS21680。ヒトA<sub>2B</sub>受容体用：5 nmol/L [<sup>3</sup>H]-DPCPX。ラット又はヒトA<sub>3</sub>受容体用：0.1 nmol/L [<sup>125</sup>I]-AB-MECA (N<sup>6</sup>-4-amino-3-iodobenzyladenosine-5'-N-methyluronamide、

GE Healthcare Biosciences)。モルモットのアデノシン輸送体用：4 nmol/L [<sup>3</sup>H]-NBTI (S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine、PerkinElmer Life & Analytical Sciences)。

なお、マーモセットA<sub>1</sub>受容体、ヒトA<sub>1</sub>受容体、マウスA<sub>2A</sub>受容体、イヌA<sub>2A</sub>受容体、マーモセットA<sub>2A</sub>受容体、ヒトA<sub>2A</sub>受容体及びヒトA<sub>2B</sub>受容体の評価時には、内在性のアデノシンの影響を除くため、反応溶液中にアデノシンデアミナーゼ (Sigma-Aldrich) を加えた。トリチウム標識タイプのトレーサー (A<sub>1</sub>、A<sub>2A</sub>及びA<sub>2B</sub>受容体、並びにアデノシン輸送体) は液体シンチレーションを、<sup>125</sup>I標識タイプのトレーサー (A<sub>3</sub>受容体) についてはγカウンタを用いて、それぞれ放射能含有量を測定した。

### 1.1.3 放射性リガンド結合アッセイ：アデノシン以外のリガンドに対する受容体、輸送体、及びチャネル

アデノシン以外の分子に対する受容体、輸送体又はチャネルに関する結合アッセイには、Table 3 に示す種々の膜画分を用いた。各々の膜画分を 1×10<sup>-5</sup> mol/Lのイストラデフィリン及び放射性標識したトレーサーを含む溶液中でインキュベートした。反応温度は、ノルエピネフリン輸送体、ドパミン輸送体、セロトニン (5-hydroxytryptamine; 5-HT) <sub>1A</sub>受容体又はグルココルチコイド受容体評価時は 4°C、カンナビノイドCB<sub>1</sub>受容体又はCB<sub>2</sub>受容体の評価時は 30°C、5-HT<sub>2A</sub>受容体、5-HT<sub>2B</sub>受容体又は 5-HT<sub>5A</sub>受容体評価時は 37°C、それ以外は 25°Cとした。各々の受容体、輸送体又はチャネルのリガンドを用いた放射性標識トレーサーはTable 3 に示した。また、GABA<sub>B</sub>受容体選択的な結合阻害の評価では、イソグバシン (isoguvacine、Sigma-Aldrich) をGABA<sub>A</sub>受容体のマスキング試薬として使用した。GABA輸送体選択的な結合阻害の評価では、イソグバシン及びバクロフェン (baclofen、Sigma-Aldrich) をそれぞれGABA<sub>A</sub>受容体及びGABA<sub>B</sub>受容体のマスキング試薬として使用した。

反応時間は、セロトニン 5-HT<sub>5A</sub>受容体の評価時は 15 分間、ヒスタミンH<sub>1</sub>受容体又は 5-HT輸送体の評価時は 30 分間、5-HT<sub>6</sub>又は 5-HT<sub>7</sub>受容体の評価時は 90 分間、μオピオイド受容体の評価時は 150 分間、グルココルチコイド受容体の評価時は 18 時間とし、これら以外は 60 分間とした。

グルココルチコイドのアッセイ系については、リガンドが結合した受容体を分離するため、デキストラン-チャコール溶液の添加後、反応溶液を遠心分離した。その他の系では、反応溶

液を細胞ハーベスターにより濾過した。トリチウム標識タイプのトレーサーは液体シンチレーションを、<sup>125</sup>I標識タイプのトレーサーについてはγカウンタを用いて、それぞれ放射活性を測定した。

#### 1.1.4 モノアミン代謝に関与する酵素に対する酵素阻害アッセイ

Hayashiらの従来法<sup>26)</sup>に修正を加え、 $1 \times 10^{-5}$  mol/LのイストラデフィリンのヒトMAO-Aの阻害作用、並びに $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 及び $1 \times 10^{-4}$  mol/LのイストラデフィリンのヒトMAO-Bの阻害作用を評価した。各々の濃度のイストラデフィリンを33.3 µg/mLの酵素 {遺伝子組み換えヒトMAO-A又はMAO-B (共にSigma Aldrich)} 及び基質 {MAO-A阻害評価用：<sup>14</sup>C]-5-HT (GE Healthcare Bio-Sciences) を含む0.5 mmol/L 5-HT (Sigma Aldrich)、MAO-B阻害評価用：<sup>14</sup>C]-Phenylethylamine (PerkinElmer Life & Analytical Sciences) を含む0.05 mmol/L Phenylethylamine (Sigma Aldrich)} を加えた10 mmol/Lのリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で37°C、20分間反応させた後、1.5倍容量の2 mol/L塩酸を添加して反応を停止させた。

Nikodejevicらの従来法<sup>27)</sup>に修正を加え、 $1 \times 10^{-5}$  mol/Lのイストラデフィリンのブタカテコール-O-メチル基転移酵素 (catechol-O-methyltransferase; COMT) の阻害作用を評価した。 $1 \times 10^{-5}$  mol/Lのイストラデフィリンを150 units/mLの酵素 {ブタ肝臓由来COMT (Sigma Aldrich)} 及び基質 {S-Adenosyl-L-(methyl-<sup>14</sup>C)-methionine (PerkinElmer Life & Analytical Sciences) を含む0.4 mmol/Lのadenosyl methionine (Sigma Aldrich)} を加えた50 mmol/Lのトリス-塩酸緩衝液 {1 mmol/Lのprotocatechuic acid、1 mmol/LのMgCl<sub>2</sub>、0.5 mmol/Lのdithiothreitol及び0.1 mmol/Lのエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) を含む} (pH 7.9) 中で37°C、15分間反応させた後、10倍容量の1 mol/L塩酸を添加して反応を停止させた。

生成物を有機溶媒 (MAO-A 評価用：酢酸エチル。MAO-B 評価用：トルエン。COMT 評価用：ジエチルエーテル) を用いて抽出し、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した。

#### 1.1.5 アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体に対する機能アッセイ

American Type Culture Collectionより入手したラット褐色細胞腫PC-12細胞を15 vol.%のウマ血清 (Invitrogen) 及び2.5 vol.%のウシ胎児血清 (Invitrogen) を添加したF12 K培地



(Invitrogen) 中で培養し、試験に用いた。Hideらの従来法<sup>28)</sup> に修正を加えて、アデノシンA<sub>2A</sub>受容体に関するイストラデフィリンの機能的な拮抗活性を、A<sub>2A</sub>受容体選択的作動薬CGS21680 (Sigma-Aldrich) によって誘導されるPC-12 細胞内のcAMPの蓄積量によって、評価した。

PC-12 細胞の懸濁液 (2×10<sup>4</sup> cells/500 μL)、イストラデフィリン (0、1.5、3 又は 10 nmol/L) 及びCGS21680 (0、3、10、30、100、300、1,000 又は 3,000 nmol/L) を 20 mmol/LのHEPES緩衝溶液を含むハンクス平衡塩溶液中で 37°C、15 分間インキュベートした。反応溶液中には、cAMPの分解を阻害するために 27 μmol/Lのロリプラム (rolipram、Sigma-Aldrich)、及び、内因性アデノシンを除去するために 1.35 units/mLのアデノシンデアミナーゼ (Sigma-Aldrich) を添加した。2 分間反応溶液の温度を 95°C以上に上げ細胞膜を破壊することにより反応を終了させた後、反応混合物を 4°C、1,000 rpmで 5 分間遠心分離した。cAMP Biotrak™ Enzyme immunoassay System (GE Healthcare Bio-Sciences) を用い、上清中のcAMP含量を添付の説明書の方法に従って測定した。

#### 1.1.6 データの解析

受容体に対する阻害率 (%) は、2 連で行なった実験の平均値を小数点以下 2 位まで表した。その他の数値は、特に記載のない場合 3 回の独立した実験の平均値及び標準誤差を有効数字 2 桁で表した。

##### 1.1.6.1 放射性リガンド結合アッセイ

次式により放射性リガンドの結合率を算出した。

$$\text{結合率 (\%)} = 100 \times [(B-N)/(B_0-N)]$$

B : 被験物質存在下の放射活性値

B<sub>0</sub> : 被験物質非存在下の放射活性値

N : 過剰量の非標識リガンド添加時の放射活性値

次式により結合阻害率を算出した。

$$\text{結合阻害率 (\%)} = 100 - (\text{結合率})$$

アデノシン関連の分子に対する結合アッセイでは、Probit法 (logisticモデル) により 50%阻害濃度 (50% inhibitory concentration; IC<sub>50</sub>値) を算出した。また、放射性標識リガンドの解離定数 (K<sub>d</sub>値) はEBDA (Elsevier-Biosoft) 及びLIGAND (Inte: Ligand) プログラムを用いScatchard

解析により算出した。阻害定数 (inhibition constant;  $K_i$  値) は  $IC_{50}$  値及び解離定数 (dissociation constant;  $K_d$ ) 値から Cheng-Prusoff の式に従って算出した。

#### 1.1.6.2 酵素阻害アッセイ

次式により活性率を算出した。

$$\text{活性率 (\%)} = 100 \times [(B-N)/(B_0-N)]$$

B : 被験物質存在下の放射活性値

$B_0$  : 被験物質非存在下の放射活性値

N : 被験物質非存在下、反応時間 0 で塩酸添加により反応を停止させたサンプルの放射活性

次式により結合阻害率を算出した。

$$\text{活性阻害率 (\%)} = 100 - (\text{活性率})$$

#### 1.1.6.3 機能アッセイ

cAMP 量 (fmol/ $2 \times 10^4$  cells) から、次式により応答率を算出した。

$$\text{応答率 (\%)} = 100 \times [(C-B)/(C_0-B)]$$

C : イストラデフィリン存在下又は非存在下における、CGS21680 添加時の cAMP 量

$C_0$  : イストラデフィリン非存在下における、1  $\mu\text{mol/L}$  CGS21680 添加時の cAMP 量

B : イストラデフィリン非存在下、CGS21680 非添加時の cAMP 量

50% 有効濃度 (50% effective concentration;  $EC_{50}$  値) は、統計解析ソフト SAS (Release 9.1.3, SAS Institute) を用いプロビット法により算出した。機能的拮抗活性の結合定数 (binding constant;  $K_B$  値) の値は、Schild プロット<sup>29)</sup> を用いて計算した。

## 1.2 結果

### 1.2.1 アデノシン受容体／輸送体に対するイストラデフィリンの親和性

アデノシン受容体の各サブタイプ及びアデノシン輸送体に対する親和性を*in vitro*で検討するため、各々の分子が発現する組織又は培養細胞から調製した膜画分を用い、種々の濃度のイストラデフィリン存在下、放射性標識リガンドによる*in vitro*結合アッセイを実施した。様々な種の受容体及び輸送体に対する $K_i$ 値又は $IC_{50}$ 値をTable 2 にまとめた。イストラデフィリンは、ヒト、マーモセット、イヌ、ラット及びマウスの $A_{2A}$ 受容体に対して高い親和性を示した。ヒト $A_{2A}$ 受容体に対する $K_i$ 値は  $12 \pm 0.60$  nmol/Lであった。 $A_1$ 受容体への親和性はいずれの種においても $A_{2A}$ 受容体に対する親和性より低く、特にヒトで顕著であった。（ヒト $A_1$ 受容体に対する $IC_{50} > 1000$  nmol/L）。 $A_1$ 受容体と比較してイストラデフィリンの $A_{2A}$ 受容体への選択性はすべての種で高かったが、イヌにおける $A_{2A}$ 受容体と $A_1$ 受容体に対する親和性の差は、他の種におけるものより低かった。

Subtype of receptor or transporter	Species	Source of receptors	Tracer	K <sub>i</sub> value nmol/L
Adenosine A <sub>1</sub>	Mouse	Forebrain	<sup>3</sup> H-CHA	220 ± 35
	Rat	Recombinant <sup>a)</sup>	<sup>3</sup> H-DPCPX	120 ± 4.2
	Dog	Forebrain	<sup>3</sup> H-CHA	220 ± 38
	Marmoset	Forebrain		950 ± 98
	Human	Recombinant <sup>a)</sup>	<sup>3</sup> H-DPCPX	> 1,000 <sup>*)</sup>
Adenosine A <sub>2A</sub>	Mouse	Striatum	<sup>3</sup> H-CGS21680	2.2 ± 0.058
	Rat	Recombinant <sup>a)</sup>		8.2 ± 0.23
	Dog	Striatum		65 ± 2.9
	Marmoset	Striatum		11 ± 2.1
	Human	Recombinant <sup>b)</sup>		12 ± 0.60
Adenosine A <sub>2B</sub>	Human	Recombinant <sup>b)</sup>	<sup>3</sup> H-DPCPX	150 ± 59
Adenosine A <sub>3</sub>	Rat	Recombinant <sup>c)</sup>	<sup>125</sup> I-AB-MECA	> 10,000 <sup>**)</sup>
	Human	Recombinant <sup>a)</sup>		> 1,000 <sup>**)</sup>
Adenosine transporter	Guinea pig	Brain	<sup>3</sup> H-NBTI	> 10,000 <sup>**)</sup>

Table 2. 様々な種のアデノシン受容体及び輸送体に対する親和性

データは、3回の独立した試験における平均 ± 標準誤差で示した。各々の遺伝子組み換えタンパク質は a) CHO-K1 細胞、b) HEK293 細胞、又は c) HEK293EBNA 細胞に発現させ調製した。

\*: IC<sub>50</sub>>1000 nmol/L、\*\*: IC<sub>50</sub>>10000 nmol/L、共に2回の独立した実験の結果より決定した。

### 1.2.2 アデノシン以外の受容体／輸送体に対するイストラデフィリンの親和性

アデノシン以外の受容体、輸送体及びチャネルに対する *in vitro* での親和性を検討するため、各々の分子が発現する組織又は培養細胞から調製した膜面分を用い、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L のイストラデフィリン存在下、放射性標識リガンドによる *in vitro* 結合アッセイを実施した。これらの多様な受容体、輸送体及びチャネルに対するイストラデフィリンの阻害率を Table 3 に示した。なお、各々の評価系において、トレーサーの結合が陽性対照化合物によって十分に阻害されることを予め確認した（データ未記載）。イストラデフィリンは、いずれの受容体、輸送体及びチャネルについても明確な親和性を示さなかった。

Neurotransmitter	Subtype of receptor or transporter	Source of receptors	Tracer	Inhibition (%)
Adrenaline	$\alpha_{1A}$	Rat submaxillary gland (mandibular gland)	$^3\text{H}$ -Prazosin	0.84
	$\alpha_{1B}$	Rat liver		0.00
	$\alpha_{2A}$	Human recombinant <sup>a)</sup>	$^3\text{H}$ -Rauwolscine	3.54
	$\alpha_{2C}$	Human recombinant <sup>a)</sup>		1.16
	$\beta_1$	Human recombinant <sup>b)</sup>	$^3\text{H}$ -CGP12177	0.00
	$\beta_2$	Human recombinant <sup>b)</sup>		9.51
	Noradrenaline transporter	Human recombinant <sup>c)</sup>	$^3\text{H}$ -Nisoxetine	2.57
Dopamine	$D_1$	Human recombinant <sup>d)</sup>	$^3\text{H}$ -SCH23390	8.79
	$D_2$ short	Human recombinant <sup>a)</sup>	$^3\text{H}$ -Spiperone	0.00
	$D_2$ long	Human recombinant <sup>b)</sup>		7.07
	$D_3$	Human recombinant <sup>e)</sup>		0.00
	$D_{4.2}$	Human recombinant <sup>a)</sup>		1.52
	$D_{4.4}$	Human recombinant <sup>a)</sup>		13.88
	$D_{4.7}$	Human recombinant <sup>a)</sup>		2.15
	$D_5$	Human recombinant <sup>f)</sup>	$^3\text{H}$ -SCH23390	18.04
Dopamine transporter	Human recombinant <sup>a)</sup>	$^3\text{H}$ -WIN35428	15.64	
Monoamine	Monoamine transporter	Rabbit platelet	$^3\text{H}$ -Dihydrotetrabenazine	2.67
GABA	GABA <sub>A</sub> (BZ central)	Rat brain	$^3\text{H}$ -Flunitrazepam	0.25
	GABA <sub>A</sub> (Cl channel)	Rat cerebral cortex	$^3\text{H}$ -Ethynylbicycloortho benzoate	9.98
	GABA <sub>B</sub>	Rat cerebellum	$^3\text{H}$ -GABA <sup>*)</sup>	0.75
	GABA transporter	Rat cerebral cortex	$^3\text{H}$ -GABA <sup>**) )</sup>	1.40
Acetylcholine	Muscarinic M <sub>1</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>	$^3\text{H}$ -Methyl scopolamine	3.24
	Muscarinic M <sub>2</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>		4.99
	Muscarinic M <sub>3</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>		5.70
	Muscarinic M <sub>4</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>		0.87
	Muscarinic M <sub>5</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>		0.18
	Nicotinic	Human receptor (Non-recombinant)	$^3\text{H}$ -Epibatidine	13.69
Benzo diazepine	BZP	Human recombinant	$^3\text{H}$ -Flunitrazepam	2.18
Cannabinoid	CB <sub>1</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>	$^3\text{H}$ -WIN55212-2	11.80
	CB <sub>2</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>		0.00
Histamine	H <sub>1</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>	$^3\text{H}$ -Pyrilamine	0.00
	H <sub>2</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>	$^3\text{H}$ -Tiotidine	5.11
	H <sub>3</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>	$^3\text{H}$ -N-methyl histamine	2.11
Serotonin	5-HT <sub>1A</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>	$^3\text{H}$ -8-OH-DPAT	4.57

	5-HT <sub>2A</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>	<sup>3</sup> H-Ketanserin	12.93
	5-HT <sub>2B</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>	<sup>125</sup> I-LSD	5.40
	5-HT <sub>2C</sub>	Human recombinant <sup>g)</sup>	<sup>3</sup> H-Mesulergine	12.29
	5-HT <sub>3</sub>	Human recombinant <sup>g)</sup>	<sup>3</sup> H-GR65630	0.00
	5-HT <sub>5A</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>	<sup>125</sup> I-LSD	1.54
	5-HT <sub>6</sub>	Human recombinant <sup>g)</sup>		16.66
	5-HT <sub>7</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>		29.59
		Serotonin transporter	Human recombinant <sup>g)</sup>	<sup>3</sup> H-Imipramine
Glutamate	Kainate	Rat brain	<sup>3</sup> H-Kainic acid	1.55
	NMDA (glycine site)	Rat cerebral cortex	<sup>3</sup> H-MDL105519	6.11
	NMDA (phencyclidine site)	Rat cerebral cortex	<sup>3</sup> H-TCP	13.77
	NMDA (polyamine site)	Rat cerebral cortex	<sup>3</sup> H-Ifenprodil	5.51
Neurokinin	NK <sub>1</sub>	Human recombinant <sup>h)</sup>	<sup>3</sup> H-Substance P	0.00
	NK <sub>2</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>	<sup>3</sup> H-SR48968	0.00
Opiate	δ	Human recombinant <sup>a)</sup>	<sup>3</sup> H-Naltrindole	1.13
	δ <sub>2</sub>	Human recombinant <sup>a)</sup>	<sup>3</sup> H-Naltrindole	0.00
	κ	Human recombinant <sup>f)</sup>	<sup>3</sup> H-Diprenorphine	0.00
	μ	Human recombinant <sup>a)</sup>		0.00
Glucocorticoid	Glucocorticoid	Rat liver	<sup>3</sup> H-Dexamethasone	3.52
Vasopressin	V <sub>1</sub>	Rat liver	<sup>3</sup> H-Arg-vasopressin	0.90
Calcium	Ca <sup>2+</sup> channel (N type)	Rat brain	<sup>125</sup> I-ω-Conotoxin	7.78

**Table 3. アデノシン以外の種々の受容体、輸送体及びチャネルに対する親和性**

被験薬（イストラデフィリン）の濃度は 10 μmol/L とした。データは 2 連の実験の平均値で示した。各々の遺伝子組み換えタンパク質は a) CHO-K1 細胞、b) Sf9 細胞、c) MDCK 細胞、d) L 細胞、e) CHO 細胞、f) Cham-1 細胞、g) HEK293 細胞、又は h) UC11 細胞に発現させた。

\*: イソグバシンを GABA<sub>A</sub> 受容体に対するマスキング試薬として用いた。\*\*: イソグバシン及びバクロフェンを、それぞれ GABA<sub>A</sub> 受容体及び GABA<sub>B</sub> 受容体に対するマスキング試薬として用いた。

### 1.2.3 モノアミンの代謝に関与する酵素に対するイストラデフィリンの阻害作用

1×10<sup>-5</sup> mol/L のイストラデフィリンによる MAO-A 及び COMT の阻害率は、それぞれ 0.00% 及び 6.82% であった (Table 4)。MAO-B に対するイストラデフィリンの IC<sub>50</sub> 値は 1×10<sup>-4</sup> mol/L より高かった (Table 3)。すなわち、イストラデフィリンはモノアミンの代謝に関与するこれらの酵素に対して阻害作用を示さなかった。

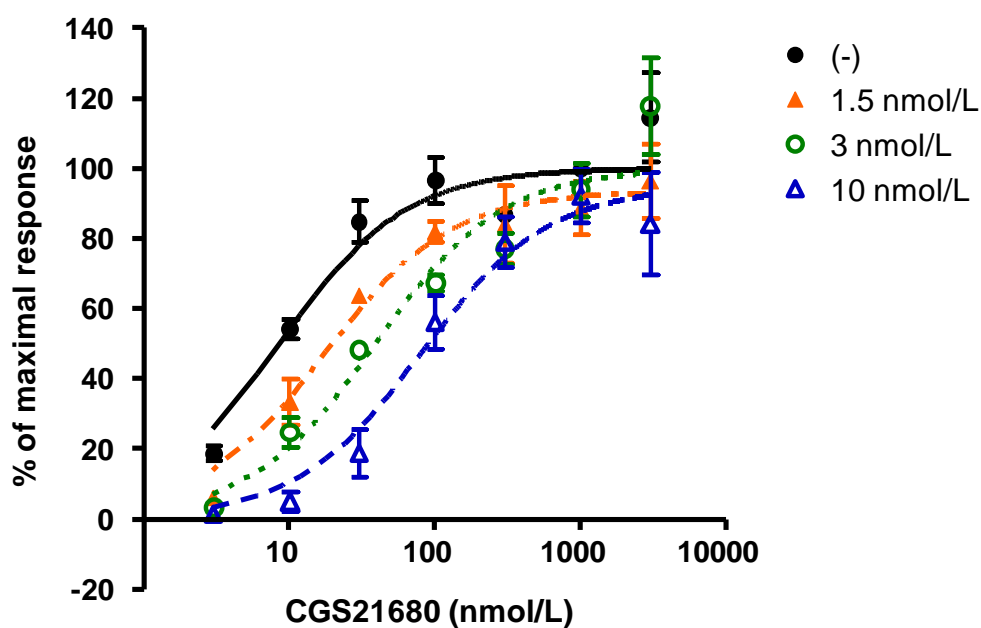
Metabolic enzyme of dopamine	Source of enzyme	Tracer	Inhibition (%)		IC <sub>50</sub> μmol/L
			10 μmol/L	100 μmol/L	
MAO-A	human recombinant	<sup>14</sup> C-Serotonin	0.00	N.T. *)	N.D. **)
MAO-B	human recombinant	<sup>14</sup> C-Phenylethylamine	0.00	0.05	>100
COMT	pig liver	S-Adenosyl-L-(methyl- <sup>14</sup> C)-methionine	6.82	N.T. *)	N.D. **)

Table 4. モノアミン代謝酵素に対する阻害作用

\*: 測定しなかった。 \*\*: 算出しなかった。

#### 1.2.4 アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体に対するイストラデフィリンの拮抗活性

PC-12 細胞において、アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体選択的な作動薬である CGS21680 の濃度上昇に伴って、細胞内に cAMP が蓄積した (Figure 3)。イストラデフィリンは、CGS21680 による反応の最大値に影響を与えることなく、用量反応曲線を高濃度側にシフトさせた。0、1.5、3 及び 10 nmol/L のイストラデフィリンの存在下、CGS21680 の EC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 9.0±0.55、28±5.4、49±7.2 及び 120±30 nmol/L であった (Figure 3)。Schild 解析の結果 K<sub>B</sub> 値は 0.74±0.23 nmol/L であった。イストラデフィリン単独では cAMP の濃度に影響を与えなかった (データ未記載)。



**Figure 3. PC-12 細胞における CGS21680 誘発 cAMP 蓄積に対する  
イストラデフィリンの拮抗作用**

CGS21680 によって誘発されるPC-12 細胞内のcAMPの蓄積をイストラデフィリン非存在下 (●) 又は存在下で比較した。イストラデフィリンの濃度は 1.5 (▲) 、3 (○) 及び 10 nmol/L (△) とし、結果はイストラデフィリン非存在下、1,000 nmol/LのCGS21680 で誘発されるcAMPの蓄積量を 100 とした割合で示した。イストラデフィリン及びCGS21680 が共に存在しない時のcAMP量は  $19 \pm 2.3 \text{ fmol}/2 \times 10^4 \text{ cells}$ であった。値は2連で実施した3回の独立した試験の平均値  $\pm$ 標準誤差で示した。



### 1.3 考察

現在までに、複数のグループが中枢神経系に発現する幾つかの受容体や酵素に対するイストラデフィリンの*in vitro*での作用を検討しており、本化合物がヒト及びラットのアドレノシンA<sub>2A</sub>受容体に高い親和性を持つことが報告されている（ヒトA<sub>2A</sub>受容体に対するK<sub>i</sub>値; 12~91.2 nmol/L、ラットA<sub>2A</sub>受容体に対するK<sub>i</sub>値; 2.2~4.46 nmol/L）<sup>24, 25)</sup>。しかし、A<sub>2A</sub>受容体以外の多様な分子に対する作用についてはほとんど情報がなかったことから、本研究では、イストラデフィリンの*in vitro*薬理プロファイルを網羅的に検討した。

まず、検討した全ての種（マウス、ラット、イヌ、マーモセット及びヒト）のアドレノシンA<sub>2A</sub>受容体に対して、イストラデフィリンが高い親和性を示すことを確認した。ヒトのA<sub>2A</sub>受容体に対するK<sub>i</sub>値は 12±0.60 nmol/Lであり、既報ともほぼ一致した。更に、イストラデフィリンはA<sub>1</sub>、A<sub>2B</sub>及びA<sub>3</sub>受容体、並びにアドレノシン輸送体と比較して、A<sub>2A</sub>受容体に対して高い選択性を示した。イストラデフィリンは、植物由来のアルカロイドで気管支拡張薬や強心薬として用いられるテオフィリン、並びに茶及びコーヒー等に含まれるカフェインと同様に、キサンチン骨格を有する。テオフィリン及びカフェインはアドレノシン受容体に対し弱い拮抗作用を持つことが古くから知られており、ヒトの全てのアドレノシン受容体サブタイプに対しほぼ同等でµmol/LオーダーのK<sub>i</sub>値を示す<sup>24)</sup>。したがって、一般的なキサンチン誘導体と比較して、イストラデフィリンは強力で選択性に優れたA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬であると考えられる。一方で、近年、非キサンチン骨格のA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬も見出されており、既にパーキンソン病を目的疾患とした臨床試験でも用いられている {preladenant (SCH 420814) 及びtozadenant (SYN-115) 等}<sup>30)</sup>。これらの化合物はA<sub>2A</sub>受容体に対しnmol/Lオーダー以下の強い親和性を示し、A<sub>1</sub>、A<sub>2B</sub>及びA<sub>3</sub>受容体と比較してA<sub>2A</sub>受容体に 10~1,000 倍の高い選択性を示す<sup>24, 31-33)</sup>。すなわち、これらの化合物はA<sub>2A</sub>受容体に対する親和性及びアドレノシン受容体サブタイプ間の選択性においてイストラデフィリンより優れているといえる。しかし、これらの化合物のアドレノシン受容体以外に対する作用についてはほとんど報告されていない。

うつ症状に関連が深いと考えられるドパミン受容体 (D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>、D<sub>4</sub>及びD<sub>5</sub>)、セロトニン受容体 (5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>2A</sub>、5-HT<sub>2B</sub>、5-HT<sub>2C</sub>、5-HT<sub>3</sub>、5-HT<sub>5A</sub>、5-HT<sub>6</sub>及び 5-HT<sub>7</sub>) 及びアドレナリン受容体 (α<sub>1A</sub>、α<sub>1B</sub>、α<sub>2A</sub>、α<sub>2C</sub>、β<sub>1</sub>及びβ<sub>2</sub>) を含む全ての受容体、輸送体及びチャンネル

に対し、10  $\mu\text{mol/L}$ のイストラデフィリンによる阻害率は 29.59%以下であった。 $[^{11}\text{C}]$ イストラデフィリンをトレーサーとして用いたポジトロン放出断層撮影法 (positron emission tomography; PET) を用いた解析から、5 mg/dayのイストラデフィリンを経口反復投与することにより、ヒト脳内アデノシン $\text{A}_{2\text{A}}$ 受容体は 90%以上占有されることが報告されている<sup>34)</sup>。また、ヒト脳内の $\text{A}_{2\text{A}}$ 受容体をほぼ完全に遮断すると考えられる 40 mg/day経口反復投与での血中の最高濃度 (maximum concentration;  $\text{C}_{\text{max}}$ 値) は 35.80 nmol/Lであった。したがって、本研究の結果から、少なくともヒトにおいて、イストラデフィリンは $\text{A}_{2\text{A}}$ 受容体以外には実質的に結合しないと考えられる。

MAO-A、MAO-B及びCOMTはいずれもモノアミンの代謝に関与する酵素であり、その抑制によりモノアミンの利用効率が高まることから、うつ症状に何らかの影響を与える可能性がある。実際に、米国等の一部の国ではMAO阻害剤が抗うつ薬として利用されており、また、COMTの遺伝子多型が一般的な抗うつ薬の作用に影響を与えることが報告されている<sup>35)</sup>。本研究では、10  $\mu\text{mol/L}$ のイストラデフィリンはMAO-A、MAO-B及びCOMTのいずれに対してもほとんど阻害作用を示さないことを明らかにした。また 2003 年にCastagnoliらは、イストラデフィリンのMAO-B阻害の $\text{K}_i$ 値が 28  $\mu\text{mol/L}$ であったことを報告しているが<sup>36)</sup>、本研究においてはMAO-B 阻害に対するイストラデフィリンの $\text{IC}_{50}$ 値は 100  $\mu\text{mol/L}$ 以上であった。いずれにせよ、 $\text{A}_{2\text{A}}$ 受容体親和性との間には大きな隔たりがあることから、臨床において $\text{A}_{2\text{A}}$ 受容体拮抗活性を主薬効として用いる場合、イストラデフィリンはMAO-A、MAO-B及びCOMTのいずれについても阻害しないと考えられる。

ホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase; PDE) 阻害剤であるロリプラムは抗うつ様作用を持つことが報告されている<sup>37)</sup>。一方で、前述のカフェイン及びテオフィリン等のキサンチン誘導体の一部はPDEに弱い阻害作用があることから<sup>38)</sup>、イストラデフィリンが同様の作用を持つ可能性がある。しかし、イストラデフィリンのE-Z異性体混合物を用いた予備的な試験では、10  $\mu\text{mol/L}$ ではイヌPDEのアイソザイム (I-V型) は抑制されなかった (データ未記載)。したがって、イストラデフィリン (E体) も臨床で使用される用量ではPDEの活性に影響を与えないと考えられる。

次に、ラット褐色細胞腫PC-12 細胞を用い、アデノシン $\text{A}_{2\text{A}}$ 受容体選択的作動薬であるCGS21680 に対するイストラデフィリンの拮抗活性を検討した<sup>39)</sup>。PC-12 細胞は $\text{A}_{2\text{A}}$ 及び $\text{A}_{2\text{B}}$ 受

容体を内在性に発現しているが、 $A_1$ 及び $A_3$ 受容体は発現していない<sup>40)</sup>。更に、PC-12 細胞においてCGS21680 で誘導されるcAMPの蓄積は $A_{2B}$ 受容体ではなく $A_{2A}$ 受容体の活性化を介していることが報告されている<sup>28)</sup>。本研究で用いたイストラデフィリンの濃度 (1.5、3 又は 10 nmol/L) は上記の結合アッセイから得られた $A_{2A}$ 受容体に対する $K_i$ 値 (8.2 nmol/L, Table 2) を参考にした。イストラデフィリンはCGS21680 により誘導される $A_{2A}$ 受容体を介したPC-12 細胞内のアデニル酸シクラーゼの活性化に拮抗し、cAMPの上昇を抑制した。イストラデフィリンは、CGS21680 による最大反応の大きさに影響を与えることなく、濃度依存的に用量反応曲線を高濃度側へシフトさせた。この結果は、 $A_{2A}$ 受容体を介した細胞内のcAMP産生に対するイストラデフィリンの作用が、単純な競合型阻害であることを示している。

#### 1.4 小括

イストラデフィリンの*in vitro*受容体プロファイルの解析により、本化合物が、アデノシン $A_{2A}$ 受容体に対して強い拮抗作用を持つこと、並びに、 $A_{2A}$ 受容体以外の受容体、輸送体及びチャンネルに対しては作用を示さないことを明らかとした。また、うつ症状に影響を与えると考えられるモノアミンの代謝に関与する酵素に対し阻害作用を持たないことを、併せて示した。

これらの結果から、*in vivo*モデルを用いたうつ症状に対する $A_{2A}$ 受容体の関与を検討する上で、イストラデフィリンが優れたツール化合物であると考えられた。

## 第2章 強制水泳試験及び尾懸垂試験を用いたアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体遮断による抗うつ作用の評価

げっ歯類を用いたFST及びTSTによる評価で、アデノシンA<sub>2A</sub>受容体を欠損したマウスがうつ様症状を示すことが報告されている<sup>9, 10)</sup>。本研究では、FST及びTSTを用い、主としてイストラデフィリンを評価ツールとしてA<sub>2A</sub>受容体とうつ症状の関係を詳細に検討した。また、これらの評価系では随意運動への影響により擬陽性が生じる可能性があることから、視床下部-下垂体-副腎系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA軸) に対する機能修飾がA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬の作用に与える影響を検討した。加えて、A<sub>2A</sub>受容体拮抗薬とSSRI、SNRI及びMAO-B阻害剤との併用効果を検討することにより、A<sub>2A</sub>受容体とうつ症状の関連について作用メカニズムを検証した。

### 2.1 材料及び方法

#### 2.1.1 使用動物

オス Sprague-Dawley (SD) ラット (7-8 週齢、220-320 g)、オス ddY マウス (22-25 g) 及びオス ICR マウス (4-5 週齢) を日本 SLC (株) より購入し、それぞれラット FST、マウス FST 及びマウス TST に用いた。全ての試験において、新規の動物を使用した。これらの動物を、気温 22-24°C、湿度 50-60% に設定した動物飼育室で、自由な摂餌及び飲水が可能で予備飼育の後、試験に用いた。

#### 2.1.2 使用薬剤

イストラデフィリンは、協和発酵キリン (株) で合成されたものを 0.3% Tween 80 (Wako Pure Chemical Industries) 水溶液に懸濁した後、遮光した褐色ビンに入れて用いた。イミプラミン (imipramine hydrochloride、TCA、Sigma-Aldrich)、キンピロール (quinpirole hydrochloride、D<sub>2</sub>様受容体作動薬、RBI) 及び 8-OH-DPAT {(R)-(+)-8-hydroxy-DPAT hydrobromide、5-HT<sub>1A</sub>受容体作動薬、RBI} は生理食塩水に溶解させた。フルオキセチン (fluoxetine hydrochloride、SSRI、Sigma-Aldrich)、ベンラファキシン (venlafaxine hydrochloride、SNRI、Sigma-Aldrich)、セレギリン {(R)-(-)-deprenyl hydrochloride、MAO-B阻害剤、Tocris Bioscience} は注射用水に溶

解させた。デシプラミン (desipramine hydrochloride、TCA、Sigma-Aldrich) は 0.3% CMC (sodium carboxymethyl cellulose、J.P.) 水溶液に懸濁させた。コルチコステロン (corticosterone、副腎皮質ホルモン、Sigma-Aldrich) は 0.3% Tween 80 水溶液に懸濁させた。特に明示しない場合、ラットに対して経口 2 mL/kg、皮下又は腹腔内 1 mL/kg、マウスに対しては全ての経路で 10 mL/kgの容量で投与した。

### 2.1.3 行動薬理学的評価

動物を用いた全ての実験は、協和発酵キリン (株) の動物実験委員会によって承認された方法に従い実施した。行動評価は、投与薬液の情報を観察者に伝えないブラインド条件下で実施した。

#### 2.1.3.1 ラット強制水泳試験

単剤投与試験は、28 匹のラットを 7 匹ずつからなる 4 群に分けて実施した。コルチコステロン併用投与試験は、36 匹のラットを 6 匹ずつからなる 6 群に分けた試験を 2 度実施し、一群 12 匹とした。

FSTは温水 (25±1°C) を深さ 170 mmまで入れたアクリル製の透明な円筒形の容器 (内径 180 mm、高さ 400 mm) を用い、Porsoltらの方法<sup>41)</sup> に従って実施した。1 日目にはラットを容器に入れ 20 分間放置した。容器から取り出し、ペーパータオルで良く拭いた後、ホームケージに戻した。翌日、同じ容器にラットを入れ、垂直方向の動き (よじ登り行動及びもがき行動) 及び水平方向の動き (水泳行動) が観察されない時間を不動時間とし、容器に入れた直後から 5 分間これを計測した。この不動状態をbehavioral despair、すなわち、うつ様行動と見なした。コルチコステロンを除く被験薬は、不動時間の計測 24、5 及び 1 時間前に投与した。1 回目の投与は 1 日目の 20 分間の水泳の 20 分後に実施した。コルチコステロンを併用投与する試験では、被験薬の最終投与と同時にコルチコステロン (1.25 mg/kg.) を皮下投与した。

#### 2.1.3.2 マウス強制水泳試験

マウスを 1 群 10 匹に分けて実施した。

FSTは温水 (23±1°C) を深さ 90 mmまで入れたアクリル製の透明な円筒形の容器 (内径 100 mm、高さ 250 mm) を用い、Porsoltらの方法<sup>42)</sup> に従って実施した。マウスを容器に入れて 2 分

後から 4 分間（6 分後まで）、ラットと同様の指標で不動時間を計測した。被験薬は、経口投与の場合は不動時間計測の 1 時間前、皮下投与又は腹腔内投与の場合は 30 分前にそれぞれ投与した。

### 2.1.3.3 マウス尾懸垂試験

単剤投与試験においては、イストラデフィリン、フルオキセチン及びパロキセチンの評価での溶媒投与群に 1 群 16 匹のマウスを用いた。パロキセチン投与群は 1 群 18 匹とした。それ以外の薬剤処置群は 1 群 10 匹とした。併用投与試験では、全て 1 群 10 匹とした。

TSTはSteruらの方法<sup>43)</sup>に従って実施した。すなわち、地面から 600 mmの高さに水平に設置したアクリル製の棒にマウスの尻尾をテープで固定し、その 2 分後から 4 分間（6 分後まで）不動時間を計測した。被験薬は、不動時間計測の 1 時間前に経口投与した。

### 2.1.4 統計解析

中央値の算出には Prism 4（Version 4.03、GraphPad Software. Inc.）を用い、その他の統計解析には、統計解析ソフト SAS（Release 9.2、SAS Institute Inc.）を使用した。本文中のデータは中央値で表した。

単剤投与試験の場合、ラット FST、マウス FST 及びマウス TST のいずれにおいても、種々の濃度の被験薬が不動時間に与える影響を Kruskal-Wallis test 及び Steel test を用いて検定した。ラット FST においては各々の被験薬の濃度におけるコルチコステロンの作用を Wilcoxon rank sum test を用いて解析した。イストラデフィリンと他の抗うつ作用を持つ薬剤との併用投与試験の場合、溶媒投与群と併用投与群の成績を Wilcoxon rank sum test により比較した。いずれの場合も危険率  $P < 0.05$  を有意差の基準とした。

なお、デンプラミンの抗うつ様作用に対するコルチコステロンの影響を検討したラット FST において、溶媒投与群の 12 匹中の 1 匹が 2 日目の不動時間の評価時に溺死したことから、このラットのデータは統計解析には用いなかった。

## 2.2 結果

### 2.2.1 ラット強制水泳試験におけるイストラデフィリンの作用

イストラデフィリン (0.16-2.5 mg/kg、経口投与) を 2 日間で 3 回 (不動時間の計測の 24、5 及び 1 時間前) 反復投与すると、0.16 mg/kg 以上の用量での投与時に、不動時間が有意に短縮した (Figure 4a)。デシプラミン (5-20 mg/kg、腹腔内投与) 及びイミプラミン (5-20 mg/kg、腹腔内投与) でも、それぞれ 5 mg/kg 以上 (Figure 4b) 及び 10 mg/kg 以上 (Figure 4c) の用量での投与時に、不動時間が有意に短縮した。8-OH-DPAT (0.1-1 mg/kg、皮下投与) 及びキンピロール (0.04-0.63 mg/kg、腹腔内投与) でも、それぞれ 0.5 mg/kg 以上 (Figure 4d) 及び 0.16 mg/kg 以上 (Figure 4e) の用量での投与時に、不動時間が有意に短縮した。

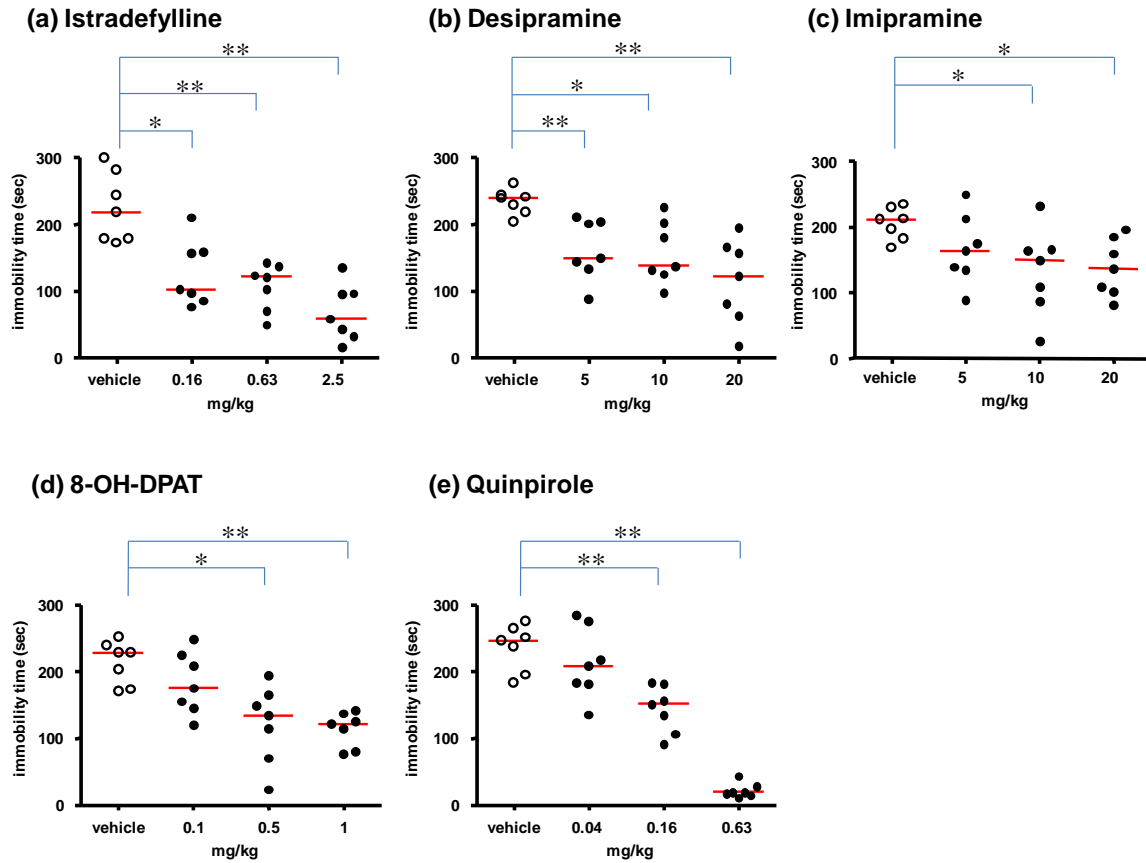


Figure 4. ラット FST における不動時間に各種の化合物が与える影響

ラット FST において、イストラデフィリン (0.16、0.63 又は 2.5 mg/kg、経口投与) (a)、デンプラミン (5、10 又は 20 mg/kg、腹腔内投与) (b)、イミプラミン (5、10 又は 20 mg/kg、腹腔内投与) (c)、8-OH-DPAT (0.1、0.5 又は 1 mg/kg、皮下投与) (d) 若しくはキンピロール (0.04、0.16 又は 0.63 mg/kg、腹腔内投与) (e) を 3 回反復投与した時、不動時間が受ける影響。グラフの点は各々のラットの不動時間 (秒)、赤線は各群 7 匹の中央値を示す。初回の投与は 1 日目の 20 分間の水泳の 20 分後に、2 回目及び 3 回目の投与は 2 日目の不動時間の計測の 5 及び 1 時間前にそれぞれ実施した。\*  $p < 0.05$  又は \*\* $p < 0.01$  は溶媒投与群との比較を示す (Steel test)。

## 2.2.2 ラット強制水泳試験におけるイストラデフィリンの作用に対するコルチコステロンの影響

コルチコステロン (1.25 mg/kg、皮下投与) を単独で投与した時、ラットの不動時間は影響を受けなかった (Figure 5a-e)。しかし、イストラデフィリン (2.5 又は 5 mg/kg、3 回の経口投与) と併用投与したところ、コルチコステロンはイストラデフィリンによる不動時間の短縮作用を有意に阻害した。イストラデフィリン 2.5 及び 5 mg/kg のいずれの場合も、コルチコ



テロンの併用時の不動時間は、イストラデフィリン単独投与時の不動時間よりも有意に長く、イストラデフィリン非処置時とほぼ同等であった。

コルチコステロンの併用時、デシプラミン（10及び20 mg/kg、3回の腹腔内投与）による不動時間短縮作用は、デシプラミン単独投与時と比較して有意に減弱した（Figure 5b）。しかし、デシプラミン 20 mg/kg とコルチコステロンとの併用時、不動時間はコルチコステロン単独投与時よりも有意に短かった（Figure 5b）。デシプラミンの場合と同様、イミプラミン（20 mg/kg、3回の腹腔内投与）又は8-OH-DPAT（0.5 and 1 mg/kg、3回の皮下投与）による不動時間短縮作用はコルチコステロンの併用により有意に減弱したが、これらの化合物とコルチコステロンの併用時の不動時間はコルチコステロン単独投与時よりも短かった（Figure 5c 及び 5d）。その一方で、キンピロール（0.16 and 0.63 mg/kg、3回の腹腔内投与）による不動時間短縮作用は、コルチコステロンの併用により影響を受けなかった（Figure 5e）。

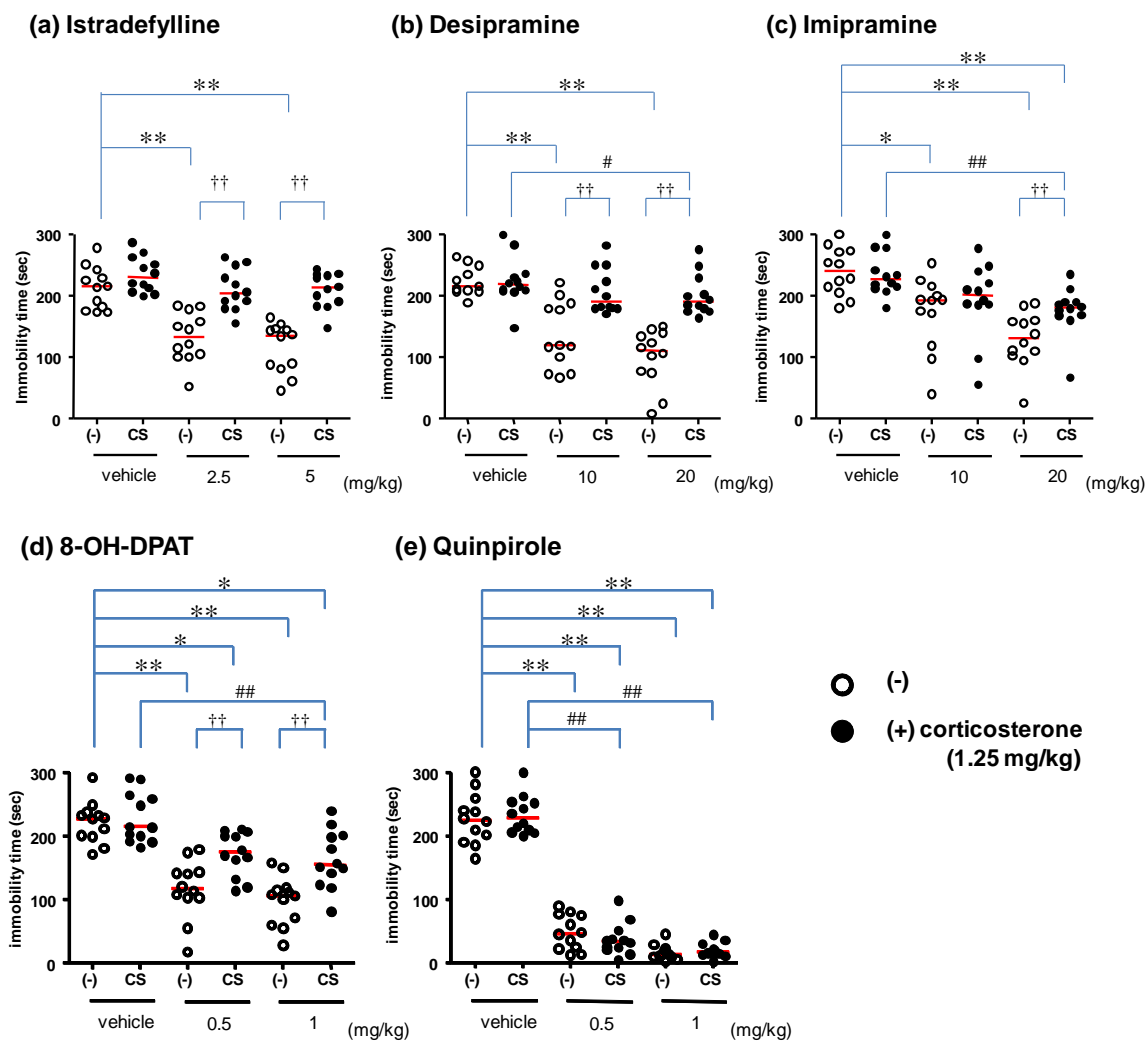


Figure 5. ラット強制水泳試験における各種の化合物の抗うつ様作用に対する  
 コルチコステロンの影響

ラット FST において、コルチコステロン (CS, 1.25 mg/kg、皮下投与) 存在下 (●)、又は非存在下 (○)、イストラデフィリン (2.5 又は 5 mg/kg、経口投与) (a)、デシプラミン (10 又は 20 mg/kg、腹腔内投与) (b)、イミプラミン (10 又は 20 mg/kg、腹腔内投与) (c)、8-OH-DPAT (0.5 又は 1 mg/kg、皮下投与) (d) 又はキンピロール (0.5 又は 1 mg/kg、皮下投与) (e) を 3 回反復投与した時、不動時間が受ける影響。各群 12 匹で試験を実施したが、デシプラミンの評価の溶媒投与群では、評価した 12 匹中の 1 匹の不動時間が計測不能であったことから、それ以外の 11 匹で解析した (b)。グラフの点は各々のラットの不動時間 (秒)、赤線は各群の中央値を示す。コルチコステロンを除く被験薬は、2 日目の不動時間の計測の 24、5 及び 1 時間前の計 3 回投与した。初回の被験薬投与は 1 日目の 20 分間の水泳の 20 分後に行ない、コルチコステロンは 2 日目の他の被験薬の最終投与と同時に投与した。\*  $p < 0.05$  又は \*\* $p < 0.01$  は溶媒投与群 (コルチコステロン非存在下) との比較を示す (Steel test)。††  $p < 0.01$  は同用量の被験薬投与群 (コルチコステロン非存在下) との比較を示す (Wilcoxon rank sum test)。#  $p < 0.05$ 、##  $p < 0.01$  は溶媒投与群 (コルチコステロン存在下) との比較を示す (Steel test)。

### 2.2.3 マウス強制水泳試験におけるイストラデフィリンの作用

イストラデフィリン (0.08-1.25 mg/kg、経口投与) は単回投与で 0.16 mg/kg 以上の用量において不動時間を有意に短縮した (Figure 6a)。デシプラミン (1.25-80 mg/kg、経口投与) は単回投与ではマウスの不動時間に影響を与えなかったが (Figure 6b)、1 日 1 回 8 日間反復投与すると 80 mg/kg 以上の用量で不動時間を有意に短縮させた (Figure 6e)。8-OH-DPAT (0.08-1.25 mg/kg、皮下投与) は単回投与では 0.63 mg/kg の用量のみで不動時間を短縮させた (Figure 6c)。キンピロール (0.16-2.5 mg/kg、腹腔内投与) は単回投与で 0.63 mg/kg 以上の用量において不動時間を有意に短縮し、1.25 mg/kg 又以上の用量では不動時間は全く計測されなかった (Figure 6d)。

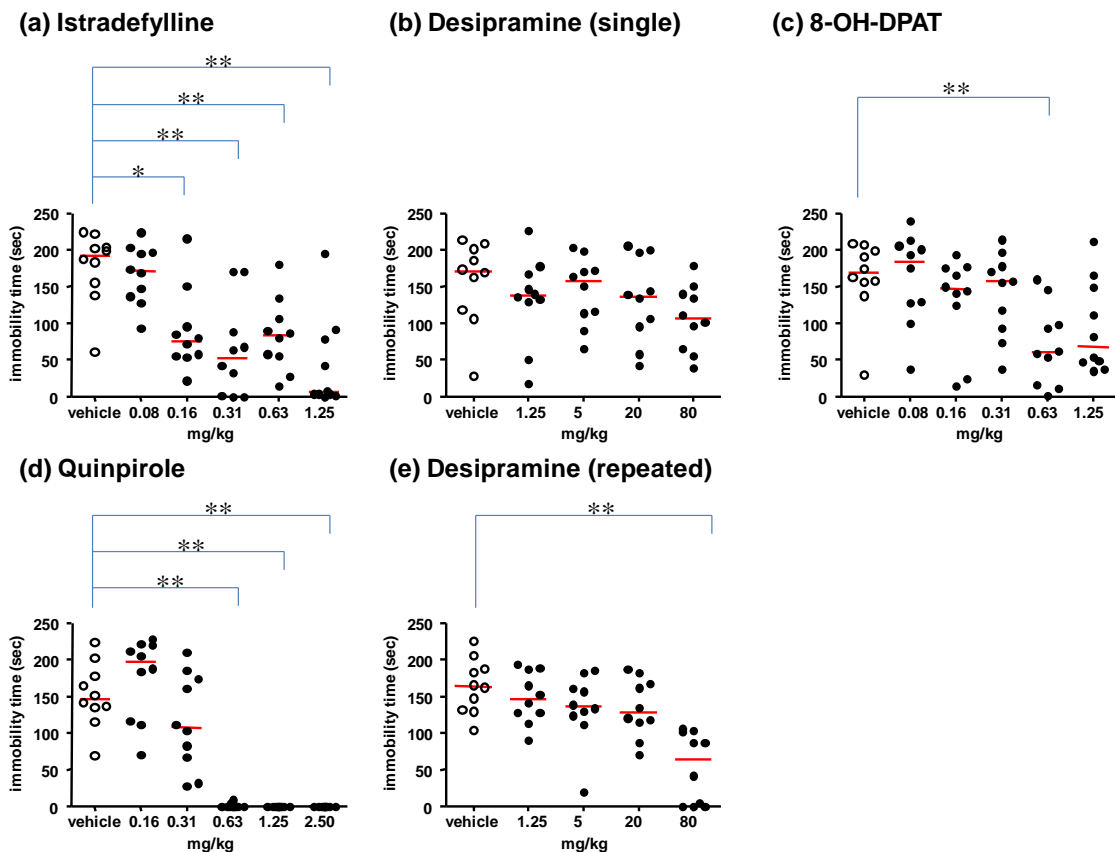


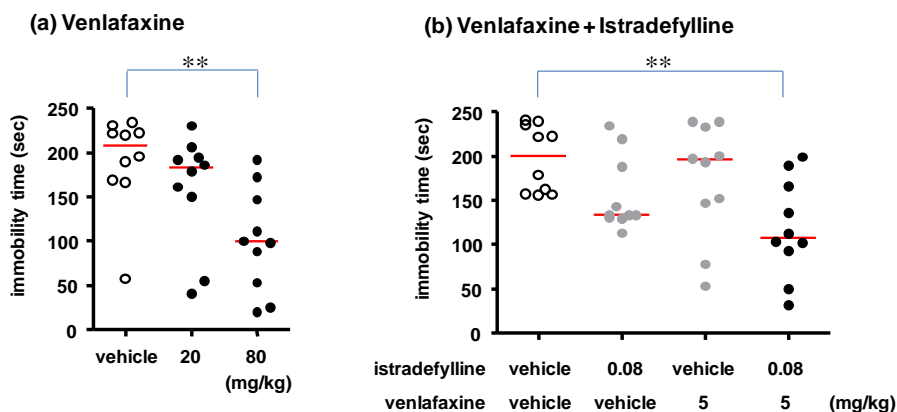
Figure 6. マウス強制水泳試験における種々の化合物の作用

マウス FST において、単回 (a-d) 又は反復 (e) 投与したイストラデフィリン (0.08、0.16、0.31、0.63 又は 1.25 mg/kg、経口投与) (a)、デシプラミン (1.25、5、20 又は 80 mg/kg、経口投与) (b、e)、8-OH-DPAT (0.08、0.16、0.31、0.63 又は 1.25 mg/kg、皮下投与) (c) 又はキンピロール (0.16、0.31、0.63、1.25 又は 2.5 mg/kg、腹腔内投与) (d) が不動時間に与える影響。グラフの点は各々のラットの不動時間 (秒)、赤線は各群 10 匹の中央値を示す。被験薬は、不動時間の計測の 1 時間前 (イストラデフィリン及びデシプラミン) 又は 30 分前 (8-OH-DPAT 及びキンピロール) に投与した。反復投与試験においては、デシプラミンを 1 日 1 回 8 日間投与し、最終日には不動時間の計測の 1 時間前に投与した。\*  $p < 0.05$  又は \*\* $p < 0.01$  は溶媒投与群との比較を示す (Steel test)。

## 2.2.4 マウス強制水泳試験におけるイストラデフィリンとベンラファキシンの併用効果

ベンラファキシシン (20-80 mg/kg、経口投与) は単回投与で最高用量の 80 mg/kg 時のみ不動時間を有意に短縮した (Figure 7a)。イストラデフィリン (0.08 mg/kg) 及びベンラファキシシン (5 mg/kg) は、単剤の投与で溶媒投与と比較して不動時間をそれぞれ中央値で 66.5 秒及

び 4.5 秒間短縮し、併用投与では 92.0 秒間短縮した (Figure 7b)。併用投与群の不動時間は、溶媒投与群と比較して有意に短かった (Figure 8b)。



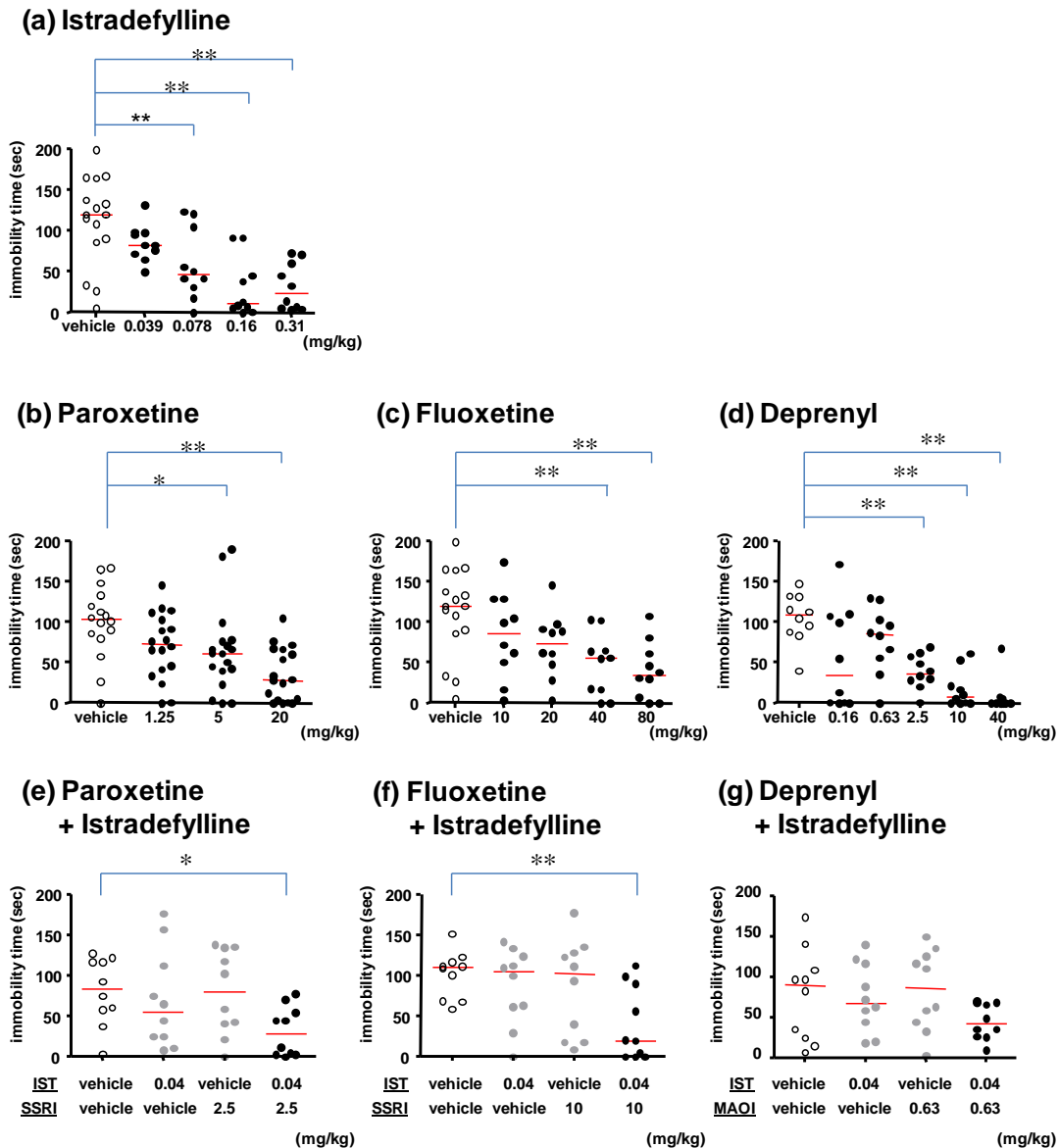
**Figure 7.** マウス強制水泳試験におけるイストラデフィリンとベンラファキシンの併用効果

マウス FST において、単独 (a) 又はイストラデフィリンと併用投与した (b) ベンラファキシンの不動時間に与える影響。グラフの点は各々のラットの不動時間 (秒)、赤線は各群 10 匹の中央値を示す。(a) 用量反応性試験において、ベンラファキシシン (20 又は 80 mg/kg、経口投与) は不動時間計測の 60 分前に投与した。(b) 併用投与試験においてはイストラデフィリン (0.08 mg/kg、経口投与) 単独、ベンラファキシシン (5 mg/kg、経口投与) 単独、又はこれらの薬剤を併用で不動時間計測の 60 分前に投与した。\*\* $p < 0.01$  は溶媒投与群との比較を示す。統計解析は Steel test (a) 又は Wilcoxon rank sum test (b) により実施した。

## 2.2.5 マウス尾懸垂試験におけるイストラデフィリンと種々の抗うつ作用を持つ薬剤との併用効果

イストラデフィリン (0.04-0.32 mg/kg、経口投与)、パロキセチン (1.25-20 mg/kg、経口投与)、フルオキセチン (10-80 mg/kg、経口投与)、又はセレギリン (0.16-40 mg/kg、経口投与) をそれぞれ単独で単回投与した場合、いずれの薬剤も用量の増加にともなって不動時間を短縮した。最小有効用量 (minimum effective dose; MED) はそれぞれ 0.08、5、40 及び 2.5 mg/kg であった (Figure 8a-d)。単独では有意な抗うつ様作用を示さない用量のパロキセチン (2.5 mg/kg) 又はフルオキセチン (10 mg/kg) とイストラデフィリン (0.04 mg/kg) の併用投与によって、不動時間が有意に短縮した (Figure 8e 及び 8f)。セレギリン (0.63 mg/kg) とイストラデフィリン (0.04 mg/kg) の併用投与による不動時間短縮作用は溶媒対照投与と比較し

て有意ではなかったが、併用投与群の不動時間の中央値（42.5 秒）は、溶媒対照群（90.5 秒）、イストラデフィリン単独投与群（67.5 秒）及びセレギリン単独投与群（87.5 秒）よりも短い傾向があった（Figure 9g）。



**Figure 8.** マウス尾懸垂試験におけるイストラデフィリンと各種抗うつ作用を持つ化合物との併用効果

マウス TST において、イストラデフィリン (0.04、0.08、0.16 又は 0.32 mg/kg、経口投与) (a)、パロキセチン (1.25、5 又は 20 mg/kg、経口投与) (b)、fluoxetine (10、20、40 又は 80 mg/kg、経口投与) (c) 又は セレギリン (0.16、0.63、2.5、10 又は 40 mg/kg、経口投与) (d) を単独投与した時、及び、閾値下用量のパロキセチン (2.5 mg/kg、経口投与) (e)、フロキセチン (10 mg/kg、経口投与) (f) 又はセレギリン (0.63 mg/kg p.o.) を閾値下用量のイストラデフィリン (0.04 mg/kg、経口投与) と併用投与した時、不動時間が受ける影響。グラフの点は各々のラットの不動時間 (秒)、赤線は各群 10-18 匹の中央値を示す。全ての化合物は不動時間計測の 60 分前に投与した。\* $p < 0.05$  又は \*\* $p < 0.01$  は溶媒投与群との比較を示す。統計解析は Steel test (a-d) 又は Wilcoxon rank sum test (e-g) により実施した。

## 2.3 考察

アデノシンA<sub>2A</sub>受容体とうつ症状の関連を調べる為、げっ歯類のうつ病モデルを用いて、第1章で強力かつ選択的なA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬であることを明らかにしたイストラデフィリンの作用を検討した。

げっ歯類を用いたFSTは、うつ症状の研究分野において最も汎用される動物モデルのひとつである。患者のうつ症状に対して利用可能な多様な抗うつ薬によって、FSTにおける動物の行動異常が改善されることから、本評価系でポジティブな作用を示す化合物はヒトのうつ症状に対しても有効である可能性がある（すなわち、本系は一定の予測妥当性を持つと考えられる）。本研究では、まず、Porsoltらの原法<sup>41)</sup>に従ってラットに被験薬を2日間で3回投与するスケジュールで評価した。三環系の抗うつ薬（TCA）であるデシプラミンやイミプラミンを陽性対照薬として評価したところ、いずれの化合物もラットの不動時間を短縮した。実際の臨床現場においてこれらの抗うつ薬の薬効発現には数週間の投与が必要であることが知られているが、本研究でのラットFSTにおいては2日間のみ投与でうつ様症状を改善した。この結果は、患者での治療効果の時間的経過と矛盾するようにみえるが、FSTにおいて一般的なTCAが本研究で用いた投与スケジュールで不動時間を短縮することは既に多く報告されている<sup>41, 42, 44, 45)</sup>。更に、幾つかのモデル動物で抗うつ様作用を示すことが報告されているセロトニン 5-HT<sub>1A</sub>受容体の完全作動薬である 8-OH-DPAT<sup>46, 47)</sup>も、ラットの不動時間を短縮した。一方でマウスFSTにおいては、デシプラミンは単回投与では不動時間を短縮する傾向が見られるのみであったが、8日間の反復投与では不動時間を有意に短縮した。8-OH-DPAT及びSNRIであるベンラファキシンは単回投与で不動時間を有意に短縮した。パロキセチン及びフルオキセチン等のSSRIの抗うつ様作用はマウスTSTでは明確であったが、SNRIであるベンラファキシンとは異なりFSTでは確認されなかった（データ未記載）。主としてセロトニン神経系又はノルアドレナリン神経系に作用する薬剤において、FSTとTSTの間でこの種の反応性の相違がみられることは既に多く報告されている<sup>45, 48)</sup>。このように、これら3種の評価系（ラットFST、マウスFST及びマウスTST）は患者のうつ症状に影響を与える薬剤に対し概ね良好な反応性を示すが、その作用プロファイルは薬剤によって若干異なる。したがって、予測妥当性の観点から、3種の全ての評価系においてA<sub>2A</sub>受容体の遮断による抗うつ効果を検討することが望ましいと考えられた。



2 日間で 3 回投与するスケジュールでのラットFSTにおける評価、及び、単回投与でのマウスFSTにおける評価のいずれにおいても、イストラデフィリンは用量の増加にもなった有意な不動時間の短縮作用を示し、そのMEDはいずれも 0.16 mg/kgであった。イストラデフィリンはマウスTSTにおいても、0.08 mg/kg以上の用量を単回投与することにより抗うつ様の作用を示した。イストラデフィリンは本研究で用いた 3 種の評価系において至適用量のTCA、SSRI及びSNRIとほぼ同等の強度の不動時間短縮作用を示したことから、A<sub>2A</sub>受容体の遮断により既存の抗うつ薬と同等の抗うつ作用を発現することが示唆された。

パーキンソン病患者の運動機能の治療薬であるイストラデフィリンは、正常ラットの自発運動を上昇させることから（データ未記載）、FSTやTSTにおける不動時間短縮作用は抗うつ作用によるものではなく、単に運動量への作用に依存する擬陽性であることが疑われる。そこで本研究では、擬陽性かどうかを判定するため、ラットのFSTにおいて、げっ歯類の主要な副腎皮質ホルモンであるコルチコステロンが、イストラデフィリンの不動時間短縮作用に与える影響を検討した。副腎皮質刺激ホルモン（adrenocorticotrophic hormone; ACTH）又はコルチコステロン投与によるHPA系の活性化は、ラットFSTにおいてうつ様行動を誘発することが報告されている<sup>49, 50)</sup>。また、間接的なHPA軸の調節が、TCA、SSRI及び 5-HT<sub>1A</sub>作動薬の抗うつ活性において重要な役割を果たしていることが明らかになっている<sup>51-53)</sup>。更に、最近の臨床研究で、グルココルチコイド受容体拮抗薬ミフェプリストン、又はグルココルチコイド合成阻害剤メチラポンによる直接的なHPA軸の制御によって、うつ病症状が改善したことが報告されている<sup>54, 55)</sup>。本研究では、イストラデフィリンによる抗うつ様の作用は、デシプラミン、イミプラミン及び 8-OH-DPATによる作用と同様に、運動活性に影響を及ぼさない程度の低い用量のコルチコステロンとの併用投与によって抑制された。この結果はラットのFSTにおけるA<sub>2A</sub>受容体遮断による不動時間の短縮作用は、運動量の影響によるのではなく、抗うつ作用によることを示唆している。また、A<sub>2A</sub>受容体遮断による抗うつ作用の少なくとも一部は、既存の抗うつ薬と同様に、HPA軸の直接的又は間接的な制御に起因する可能性がある。

その一方で、ドパミンD<sub>2</sub>様受容体作動薬であるキンピロールはラットFSTにおいて不動時間を短縮させたが、イストラデフィリン及び上記の抗うつ薬とは対照的に、キンピロールの抗うつ様作用はコルチコステロンとの併用投与でも影響を受けなかった。このことから、ラットFSTにおけるキンピロールの不動時間短縮作用は、その精神刺激活性<sup>56)</sup>に起因する偽陽性であ

ると考えられた。いずれにしても、この結果は、 $A_{2A}$ 受容体遮断による抗うつ様作用が、ドパミン作動薬とは質的に異なっていることを示している。El Yacoubiらは以前に、 $A_{2A}$ 受容体拮抗薬SCH58261がマウスを用いたFST及びTSTの両方で抗うつ様活性を示すが、その効果は、ドパミン $D_2$ 様受容体拮抗薬ハロペリドールの同時投与により消失することを報告している<sup>9)</sup>。この結果から彼らが導き出した仮説によると、 $A_{2A}$ 受容体拮抗薬は前頭皮質における $A_{2A}$ 受容体とドパミン $D_2$ 様受容体の相互作用を介して抗うつ様効果を発揮しているとされている。しかし、本研究においてイストラデフィリンとキンピロールとの間に存在したコルチコステロンに対する応答性の違いは、 $A_{2A}$ 受容体遮断による抗うつ様の効果が、 $D_2$ 様受容体と $A_{2A}$ 受容体の相互作用によるドパミン受容体シグナルのアップレギュレーションに起因するものではないことを示唆している。

既存の抗うつ薬と $A_{2A}$ 受容体拮抗薬の併用効果を検討し、これら薬剤の作用メカニズムを比較することは、うつ症状と $A_{2A}$ 受容体の関係を考察する一助となると考えられる。そこで、SNRIであるベンラファキシンとイストラデフィリンの併用効果について、マウスFSTを用いて評価した。また、SSRIであるフルオキセチン及びパロキセチンは、単独投与ではFSTで明確な薬効が見られなかったことから、これらの薬剤との併用効果はマウスTSTを用いて評価した。その結果、マウスFSTにおいては共に閾値下用量のイストラデフィリンとベンラファキシンの併用投与群で、マウスTSTにおいては共に閾値下用量のイストラデフィリンとフルオキセチン又はパロキセチンの併用投与群で、溶媒投与群と比較して有意に不動時間が短かった。少なくとも不動時間の短縮作用という観点からは明確な併用効果を示したことから、 $A_{2A}$ 受容体遮断による抗うつ様作用の発現メカニズムは既存の抗うつ薬とは異なる可能性が示唆されるが、そのメカニズムの解析には更なる詳細な検討が必要である。

MAO-B阻害剤セレギリンは本邦ではパーキンソン病運動症状の治療として用いられるのみであるが、ヒトにおいて抗うつ作用を有することが報告されており<sup>57)</sup>、米国などではうつ症状に対して用いられることがある。本研究では、単剤で処置したセレギリンがマウスTSTにおいて抗うつ作用を示し、また、共に閾値下用量のセレギリン及びイストラデフィリンの同時投与により、溶媒処置群と比較して不動時間が短縮する傾向を示した。共にセロトニン神経系への作用により抗うつ作用を発揮すると考えられるSSRIとセレギリンは、振戦、発汗、及び頻脈等を主徴とするセロトニン症候群が発現する危険性のため<sup>58)</sup>、多くの場合併用は禁忌である。

第 1 章でイストラデフィリンが、全てのセロトニン受容体及び輸送体との親和性を持たないことを示したが、今回の評価でもイストラデフィリンとセレギリンの併用でセロトニン症候群様の行動は観察されなかった。したがって、 $A_{2A}$ 受容体遮断による抗うつ様作用の発現にはセロトニン神経系は関与しないことが示唆される。なお、これらの結果から、 $A_{2A}$ 受容体の遮断はセレギリンが処方されているうつ病患者に対して、既存のSSRIと比較して、より安全な治療選択肢となる可能性があると考えられる。

## 2.4 小括

げっ歯類を用いたうつ症状の代表的なモデルであるFST及びTSTにおいて、 $A_{2A}$ 受容体遮断によりうつ様症状が改善した。その作用強度は既存の抗うつ薬とほぼ同等であった。また、マウスのFSTで単回投与でも明確な薬効を示したことから、うつ病患者における作用発現に数週間を要する既存の抗うつ薬とは異なり、 $A_{2A}$ 受容体遮断による抗うつ作用の発現は作用発現に必要な期間が短い可能性が示唆された。

### 第3章 ラット学習性無力モデルを用いたアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体遮断による抗うつ作用の評価

第2章において、アデノシンA<sub>2A</sub>受容体の遮断によって抗うつ様活性が発現することを、FSTとTSTを使用して確認した。そこで次に、FST及びTSTと比較して、表現型がヒトのうつ症状に類似しており、且つ、既存の抗うつ薬に対する反応性に優れると考えられるラットLHモデル<sup>45, 59, 60)</sup>を用いて、アデノシン受容体とうつ症状の関係について更に詳細に解析した。また、A<sub>2A</sub>受容体の遮断による抗うつ様作用に対し、ドパミン作動性、セロトニン作動性又はノルアドレナリン作動性神経伝達が関与するかを検討するため、LHにおけるイストラデフィリンの効果について薬理的に解析した。更に、既に第1章においてイストラデフィリンがA<sub>1</sub>受容体に対してほとんど親和性を示さないことを明らかにしているが、イストラデフィリンの抗うつ様作用に対するA<sub>1</sub>受容体機能の関与についても確認のため検討した。最後に、A<sub>2A</sub>受容体の遮断による抗うつ様作用に重要な脳の領域を解明することを試みた。

#### 3.1 材料及び方法

##### 3.1.1 使用動物

オス SD ラット (860 匹、5~6 週齢) を日本チャールズリバー (株) から購入し、7 日以上馴化した後使用した。全ての試験において、1 群あたり 10~15 匹の新規のラットを使用した。ラットは気温 22~24℃、湿度 50~60% に設定した動物飼育室で、動物用ペレット飼料 (Oriental Yeast) 及び水道水を自由に摂取できる状態で飼育した。

##### 3.1.2 使用薬剤

イストラデフィリンは、協和発酵キリン (株) で合成されたものを 0.3% Tween 80 (Wako Pure Chemical Industries) 水溶液に懸濁し、遮光した褐色ビンに入れて用いた。9-Chloro-2-(2-furanyl)-[1,2,4]triazolo-[1,5-c]quinazolin-5-amine (CGS15943、選択性の低いA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬、Sigma-Aldrich) 及び 8-(3-chlorostyryl)caffeine (CSC、選択性の高いA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬、Sigma-Aldrich) も 0.3 vol% Tween 80 に懸濁させた。キンピロール (quinpirole hydrochloride、ドパミンD<sub>2</sub>様受容体拮抗薬、RBI) 及びヨヒンビン (yohimbine hydrochloride、α<sub>2</sub>アドレナリン受容体

拮抗薬、Sigma-Aldrich) は生理食塩水に溶解させた。テオフィリン (theophylline、非選択的アデノシン受容体拮抗薬、Nacalai Tesque)、デシプラミン (desipramine hydrochloride、TCA、Sigma-Aldrich) 及びフルオキセチン (fluoxetine hydrochloride、SSRI、Sigma-Aldrich) は注射用水に溶解させた。8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX、A<sub>1</sub>受容体拮抗薬、Sigma-Aldrich) は 0.3 w/v% carboxymethylcellulose (Wako Pure Chemical Industries) 水溶液に懸濁させた。メチセルジド (methysergide maleate、5-HT<sub>2A/2C</sub>受容体拮抗薬、Sigma-Aldrich) 及びプロプラノロール (propranolol hydrochloride、βアドレナリン受容体拮抗薬、Sigma-Aldrich) は 0.5 w/v% methylcellulose (Wako Pure Chemical Industries) 水溶液に懸濁させた。2-p-(2-carboxyethyl) phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (CGS21680、A<sub>2A</sub>受容体作動薬、Sigma-Aldrich) 及び(-)-N6-(2-phenylisopropyl)adenosine (R-PIA、A<sub>1</sub>受容体作動薬、Sigma-Aldrich) は 50% dimethyl sulfoxide (DMSO、Wako Pure Chemical Industries) 水溶液に溶解させた。

### 3.1.3 行動薬理学的評価

動物を用いた全ての実験は、協和発酵キリン (株) の動物実験委員会によって承認された方法に従い実施した。行動評価は、投与薬液の情報を観察者に伝えない、ブラインド条件下で実施した。

#### 3.1.3.1 ラット学習性無力試験

隔壁により 2 つの区画 (220 × 200 × 260 mm) に分割したシャトルボックス (TK-401S、UNICOM) を用いた。1 日目に、2 区画のうちの 1 区画にラットを 1 匹ずつ閉じ込め、50 分間のプレコンディショニングを実施した。この期間中に、予測不可能かつ不可避なストレス (inescapable stress; IES) としてステンレス製の格子状の床から、電流値 1.3 mA の強度で持続時間 10~90 秒間からなる電撃ショックを合計 25 分間 (50 分間中) 負荷した。2 日目に、ボックス中央の障壁をラットが超えられる高さのハードル (高さ 20 mm) に置き換え、従来法<sup>61)</sup> に幾つかの変更を加えて、シャトルボックス試験を実施した。シャトルボックス試験は、条件回避トレーニングのための fixed ratio (FR) -1 セッション、及び、それに続く LH 行動評価のための FR-2 セッションの 2 セッションからなる手法を用いた。FR-1 セッションの各試行において、ブザー鳴動の 10 秒後、5 秒未満の電撃ショックを負荷した。ラットは、中央のハードルを越えてもう一方の区画に移動することにより、ショックを回避することが出来る。FR-1 セッ

セッションにおいて、各試行を 10 秒間のインターバルで 15 回繰り返した。FR-1 セッションに続いてFR-2 セッションを実施した。FR-2 セッションの各試行では、ブザーによる合図なしで 10 秒以内の電撃ショックを負荷した。ラットがショック負荷開始後 10 秒未満で一方の区画から他方へ移動した場合、0.5 秒の間隔後に電撃ショックを再度負荷した。ラットが 10 秒未満で再度適切な回避行動を示した場合、又はラットが 10 秒間回避行動を示さなかった場合、各試行を自動的に終了させた。FR-2 のセッションにおいて、各試行を 10 秒間のインターバルで 15 回繰り返した。2 日目のシャトルボックス試験においては、電撃ショックの強度は 0.6 mA とした。FR-2 セッションの各試行において、両方向の回避潜時が共に 10 秒未満であったとき、回避成功とした。

回避反応率 (escape response; ER) を次式により算出し、うつ状態の指標とした。

$$ER (\%) = 100 \times (\text{FR-2 での回避成功回数}) / 15 \text{ 試行}$$

また、FR-1 セッションの 10 秒間のインターバルにおける (回避行動ではない) 2 区画間の移動回数から試行間移行率 (intertrial response; IR) を次式により算出し、精神運動興奮の指標とした。

$$IR (\%) = 100 \times \{ (\text{FR-1 での 2 区画間の総移動数}) - (\text{FR-1 での回避回数}) \} / 15 \text{ 試行}$$

### 3.1.3.2 薬剤の全身投与

薬物溶液は、特に記載のない限り、経口投与では 2 mL/kg、腹腔内投与では 1 mL/kg の容量でラットに投与した。

単回投与試験では、薬物溶液を 2 日目の FR-1 セッションの 60 分前に経口投与 (イストラデフィリン、デシプラミン、フルオキセチン、DPCPX、テオフィリン、CGS15942 及び CSC) 、又は 30 分前に腹腔内投与 (キンピロール) した。

飲水又は反復投与試験では、水溶性の薬物 (デシプラミン及びフルオキセチン) は飲用水中に溶解させ動物に自由に摂取させることにより 2~3 週間投与した。1~5 日間隔で飲水量 (体積) 及び体重を測定して薬物の摂取量を算出し、用量は複数回の用量算出の平均値として 1 日あたりの用量 (mg/kg/day) で表した。非水溶性薬物 (イストラデフィリン) については、1 日 1 回で 2 週間経口投与した。

### 3.1.3.3 薬剤の局所投与

薬液を 50 vol%DMSO 水溶液中に溶解し、側坐核 (nucleus accumbens; NAc)、室傍核 (paraventricular nucleus; PVN)、又は線条体 (尾状核-被殻) (caudate-putamen; CPu) にカニューレを介して局所注入した。ペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg、腹腔内投与) 麻酔下でラットを脳定位固定装置 SR-6 (Narisige) に固定し、脳アトラス (the 6th edition of the Paxinos and Watson) に従って、左側 NAc (ブレグマを基準に A : 1.7 mm、L : 1.5 mm、H : 6.0 mm)、左側 PVN (P : 1.8 mm、L : 0.4 mm、H : 7.0 mm)、又は左側 CPu (AP : 0 mm、L : 3.0 mm、H : 4.0 mm) にガイドカニューレ (外径 0.8 mm、内径 0.5 mm) を挿入し、歯科用セメントを用いて頭蓋骨に固定した。一部のラットでは、ガイドカニューレを両側の NAc に左右対称に挿入した。ラットは 3 日間以上の期間をかけて外科的処置から回復させた後、試験に用いた。LH 試験の 2 日目に、ポリエチレンチューブに接続したカニューレ (外径 0.4 mm、内径 : 0.3 mm) をガイドカニューレ内に挿入し、マイクロインフュージョンポンプ (CMA/100、CMA/Microdialysis) を使用して、1  $\mu$ L/min の流量で 2  $\mu$ L/site の容量の薬液を注入した。注入の 30 分後に、FR-1 セッションを開始した。

### 3.1.4 統計学的解析

本文中の IR と ER はすべて中央値 (%) で示した。

IES 非負荷群と IES 負荷-溶媒対照群との差は、Wilcoxon rank sum test を用いて解析した。IES 負荷-溶媒対照群と IES 負荷-薬物処置群との差の解析には、Kruskal-Wallis test 及び Steel test を用いた。イストラデフィリンの作用に対する拮抗実験では、IES 負荷-溶媒/溶媒処置群、IES 負荷-イストラデフィリン/溶媒処置群及び IES 負荷-イストラデフィリン/競合薬物処置群の間の差を、Kruskal-Wallis test 及び Steel-Dwass test により評価した。p<0.05 の場合、統計的に有意とみなした。

## 3.2 結果

### 3.2.1 イストラデフィリン又は抗うつ薬の、単回、若しくは、反復又は飲水投与の効果

IES 非負荷群の回避成功の比率、すなわち ER は、イストラデフィリン又は既存の抗うつ薬の、単回、若しくは、反復又は飲水投与の作用を評価するすべての試験において 73.3%以上を維持していた。これらの試験において、IES 負荷-溶媒対照群の ER は全て 20.0%以下であり、対応する IES 非負荷群よりも有意に低かった (Figure 9a: IES 非負荷群 83.3%; IES 負荷-溶媒対照群 0%,  $p=0.0004$ ) (Figure 9b: IES 非負荷群 76.7%; IES 負荷-溶媒対照群 20.0%,  $p=0.0055$ ) (Figure 9c: IES 非負荷群,76.7%; IES 負荷-溶媒対照群 0%,  $p=0.0007$ ) (Figure 9d: IES 非負荷群 100%; IES 負荷-溶媒対照群,6.7%,  $p=0.0002$ ) (Figure 9e: IES 非負荷群 90.0%; IES 負荷-溶媒対照群 3.3%,  $p=0.0008$ ) (Figure 9f: IES 非負荷群 73.3%; IES 負荷-溶媒対照群 6.7%,  $p=0.0015$ )。単回経口投与、又は反復経口投与 (1 日 1 回、15 日間) したイストラデフィリン (1.25 及び 5 mg/kg/day) は、1.25 mg/kg/day 以上の用量で、IES 負荷による逃避行動の不全を有意に改善した (Figure 9a: IES 負荷-溶媒対照群 0%; IES 負荷-1.25 mg/kg イストラデフィリン単回投与群 33.3%,  $p=0.0137$ ; IES 負荷-5 mg/kg 単回投与群 90.0%,  $p=0.0018$ ) (Figure 9d: IES 負荷-溶媒対照群 6.7%; IES 負荷-1.25 mg/kg イストラデフィリン反復投与群 86.7%,  $p=0.0003$ ; IES 負荷-5 mg/kg 反復投与群 96.7%,  $p=0.0003$ )。イストラデフィリンは 5 mg/kg の単回投与で試行間の移行、すなわち IR を増加させる傾向を示したが、その差は IES 負荷-溶媒対照群と比較して有意ではなかった (Figure 9a: IES 負荷-溶媒対照群 3.4%; IES 負荷-5 mg/kg 投与群 23.4%,  $p=0.2007$ )。また、イストラデフィリンは 1.25 mg/kg /day の反復投与で IR を有意に増加させたが、明確な用量依存性は見られなかった (Figure 9d: IES 負荷-溶媒対照群 0%; IES 負荷-1.25 mg/kg 投与群 13.4%,  $p=0.0381$ ; IES 負荷-5mg/kg 投与群 6.7%,  $p=0.2147$ )。

デシプラミン (20 及び 80 mg/kg) 又はフルオキセチン (10 及び 40 mg/kg) の単回経口投与は、いずれも ER に明確な影響を与えなかったが (Figure 9b 及び 9c)、デシプラミン (3.2 及び 8.9 mg/kg/day、14 日間) 又はフルオキセチン (3.2 及び 7.5 mg/kg/day、22 日間) の飲水投与では、それぞれ 8.9 mg/kg/day (Figure 9e: IES 負荷-溶媒対照群 3.3%; IES 負荷-8.9 mg/kg/day デシプラミ



ン投与群 43.4%,  $p=0.0064$ ) 及び 7.5 mg/kg/day (Figure 9f: IES 負荷-溶媒対照群 6.7%; IES 負荷-7.5 mg/kg フルオキシセチン投与群 63.3%,  $p=0.01643$ ) で、有意な改善作用を示した。

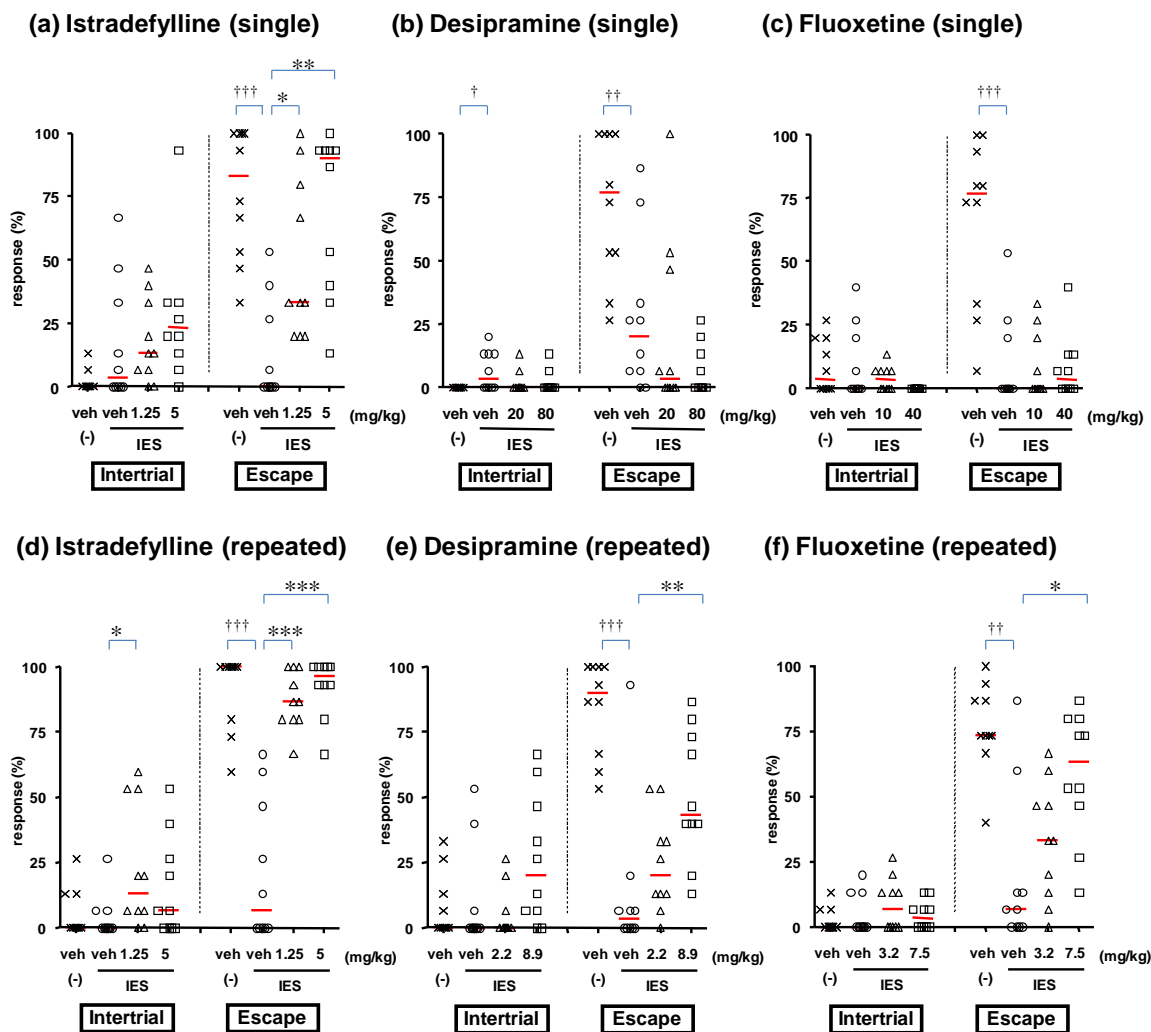


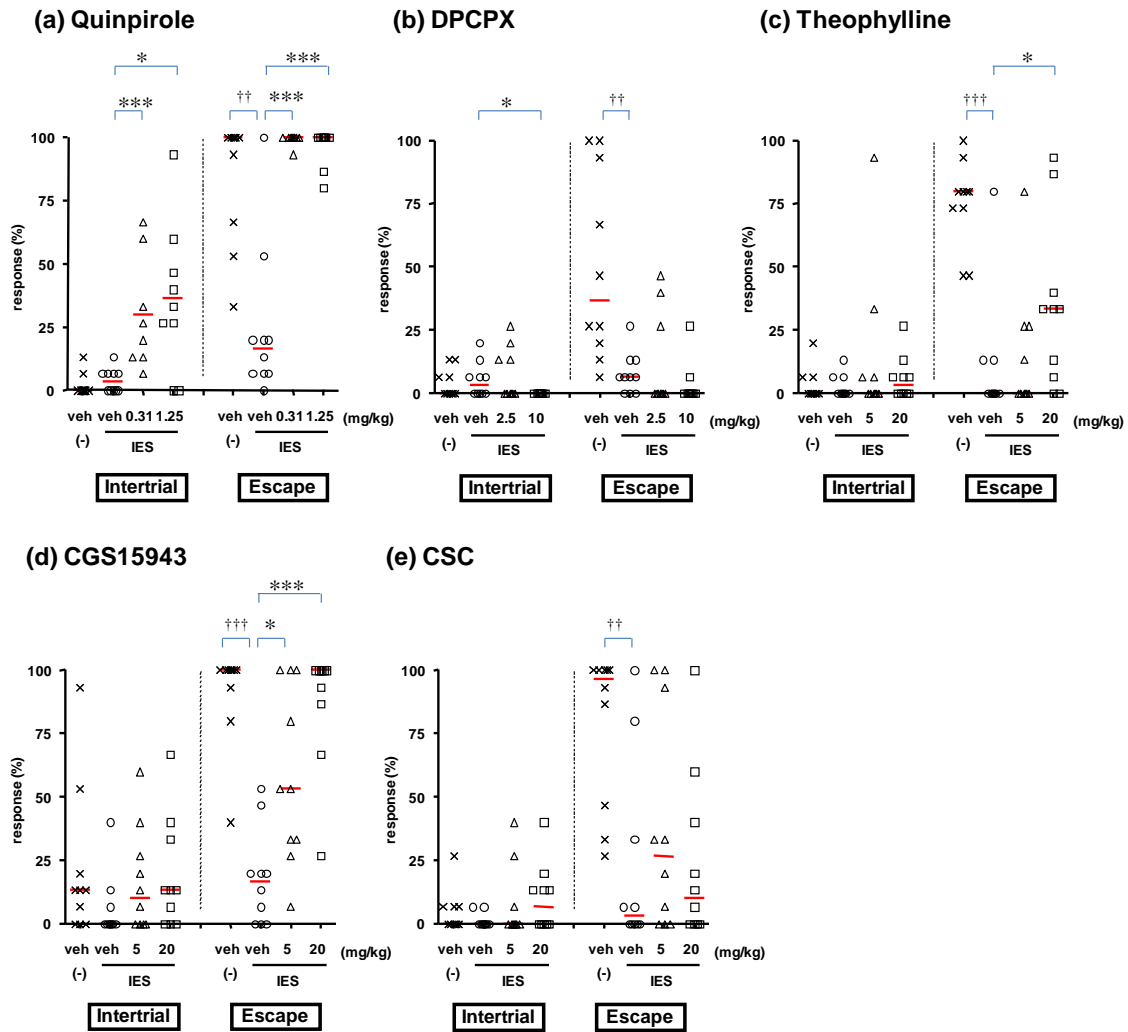
Figure 9. イストラデフィリン及び抗うつ薬がラットの LH 行動に与える効果

単回 (a-c) 若しくは、反復又は飲水 (d-f) 投与したイストラデフィリン (a 及び d)、デシプラミン (b 及び e) 又はフルオキシセチン (c 及び f) が、ラット LH 試験の FR-2 セッションにおける ER (各グラフ右側) と FR-1 セッションにおける IR (各グラフ左側) に与える効果。FR-2 セッションにおける ER の障害は、FR-1 セッションの 24 時間前に IES をラットに負荷することにより惹起した。グラフの点は各々のラットの ER 又は IR (%), 赤線は各群 10 匹の中央値を示す。単回投与試験においては、FR-1 セッションの 1 時間前に投与と溶媒 (veh)、被験薬又は対照薬を投与した。反復投与試験においては、イストラデフィリンは、1 日 1 回 13 日間投与した後、14 日目には FR-1 セッションの 1 時間前に投与した。デシプラミン又はフルオキシセチンは、それぞれ 15 日間又は 22 日間飲水投与し、FR-1 セッションの 1 時間前まで薬液を自由に摂取させた。††  $p < 0.01$  及び †††  $p < 0.001$  は IES 非負荷群との比較を示す (Wilcoxon rank sum test)。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  及び \*\*\*  $p < 0.001$  は IES 負荷-溶媒対照群との比較を示す (Steel test)。

### 3.2.2 ドパミン受容体作動薬又はアデノシン受容体拮抗薬処置の効果

腹腔内に単回投与したキンピロールは 0.31 及び 1.25 mg/kg の用量で ER を有意に改善したが (Figure 10a: IES 負荷-溶媒対照群 16.7%; IES 負荷-0.31 mg/kg 投与群 100%,  $p=0.0006$ ; IES 負荷-1.25 mg/kg 投与群 100%,  $p=0.0009$ )、同時に IR を顕著に増加させた (Figure 10a: IES 負荷-溶媒対照群 3.4%; IES 負荷-0.31 mg/kg 投与群 30%,  $p=0.0008$ ; IES 負荷-1.25 mg/kg 投与群 36.7%,  $p=0.0127$ )

単回経口投与した DPCPX (2.5 及び 10 mg/kg) は ER に対してほとんど影響を示さなかったが (Figure 10b)、テオフィリン (5 及び 20 mg/kg、経口投与) は 20 mg/kg の用量で ER の障害を有意に改善した (Figure 10c: IES 負荷-溶媒対照群 0%; IES 負荷-20 mg/kg 投与群 33.3%,  $p=0.0482$ )。更に CGS15943 (5 及び 20 mg/kg、経口投与) は 5 mg/kg 以上の用量で ER の障害を有意に改善した (Figure 10d: IES 負荷-溶媒対照群 16.7%; IES 負荷-5 mg/kg 投与群 53.3%,  $p=0.0105$ ; IES 負荷-20 mg/kg 投与群 100%,  $p=0.0004$ ) 一方で、CSC (5 及び 20 mg/kg、経口投与) は回避行動の低下にほとんど影響を示さなかった (Figure 10e)



**Figure 10.** ドパミン受容体作動薬又はアデノシン受容体拮抗薬が IES により惹起されるラットの LH 行動に与える影響

ラット LH モデルにおいて、キンピロール (a)、DPCPX (b)、テオフィリン (c)、CGS15943 (d) 又は CSC (e) が FR-2セッションにおける ER (各グラフ右側) 及び FR-1セッションにおける IR (各グラフ左側) に与える影響。FR-2セッションにおける ER の障害は、FR-1セッションの約 24 時間前にラットを IES ストレスに暴露することにより惹起した。グラフの点は各々のラットの ER 又は IR (%)、赤線は各群 10 匹の中央値を示す。被験薬は FR-1セッションの 1 時間前に投与した。††  $p < 0.01$  及び †††  $p < 0.001$  は IES 非負荷群との比較を示す (Wilcoxon rank sum test)。\*  $p < 0.05$  及び \*\*\*  $p < 0.001$  IES 負荷-溶媒対照群との比較を示す (Steel test)。

### 3.2.3 側坐核に注入したアデノシン受容体作動薬がうつ様行動に与える影響

1 日目に IES ストレスを負荷しなかったラットの片側の側坐核に、シャトルボックス試験開始の 30 分前に CGS21680 (10 又は 20  $\mu\text{g}/\text{site}$ ) を投与したところ、10  $\mu\text{g}/\text{site}$  の注入により ER は低下する傾向を示し、20  $\mu\text{g}/\text{site}$  の注入により ER は有意に低下した (Figure 11a: IES 非負荷群 86.7%; IES 非負荷-10  $\mu\text{g}/\text{site}$  注入群 23.4%,  $p=0.2108$ ; IES 非負荷-20  $\mu\text{g}/\text{site}$  注入群 3.35%,  $p=0.0110$ )。20  $\mu\text{g}/\text{site}$  の CGS21680 注入による ER の低下の程度は、1 日目に IES を負荷した群と同等以上であった (Figure 11a: IES 非負荷群 86.7%; IES 負荷群 16.7%,  $p=0.0027$ )。CGS21680 (2.5 又は 5  $\mu\text{g}/\text{site}$ ) を IES 非負荷のラットの両側の側坐核に注入した場合には、片側に注入した場合よりも低用量から ER が有意に低下した (Figure 11b: IES 非負荷群 100%; IES 非負荷-2.5  $\mu\text{g}/\text{site}$  注入群 16.7%,  $p=0.0083$ ; IES 非負荷-5  $\mu\text{g}/\text{site}$  注入群 30.0%,  $p=0.0023$ )。

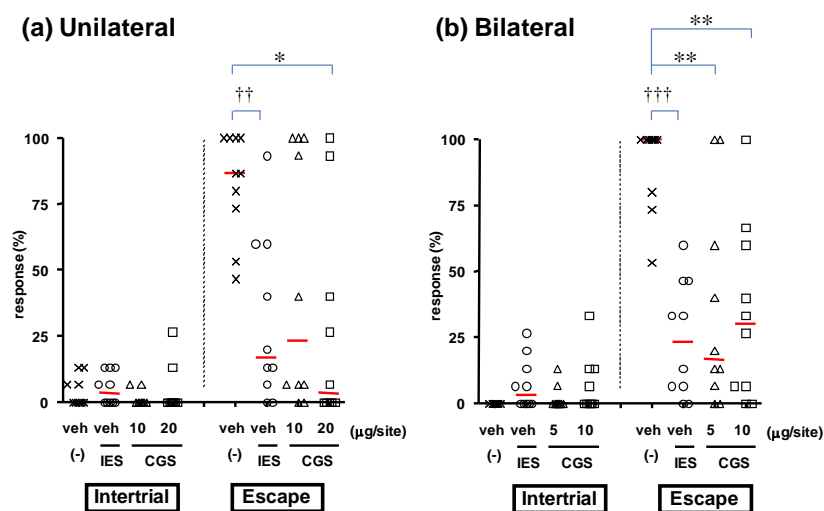


Figure 11.  $A_{2A}$ 受容体作動薬によるIES非負荷ラットに対するLH行動の惹起

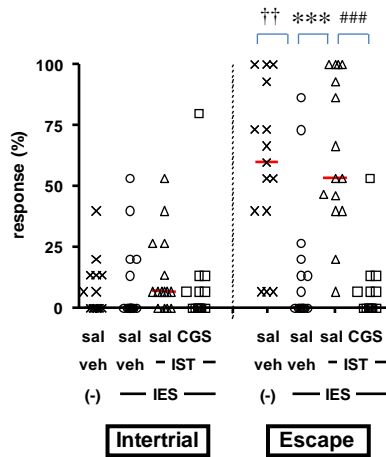
片側 (a) 又は両側 (b) の側坐核への CGS21680 (CGS) 注入が FR-2 セッションにおける ER (各グラフ右側) 及び FR-1 セッションにおける IR (各グラフ左側) に与える影響。FR-2 セッションにおける ER の障害は FR-1 セッションのおよそ 24 時間前の IES ストレスの負荷、若しくは、FR-1 セッションの 30 分前の片側又は両側の側坐核への CGS21680 の注入により惹起した。グラフの点は各々のラットの ER 又は IR (%)、赤線は各群 10 匹の中央値を示す。††  $p<0.01$  及び†††  $p<0.001$  は IES 非負荷群との比較を示す (Wilcoxon rank sum test)。\*  $p<0.05$  及び\*\*\*  $p<0.001$  は IES 非負荷群との比較を示す (Steel test)。

### 3.2.4 イストラデフィリンの抗うつ様作用に対する A<sub>2A</sub> 受容体作動薬の効果

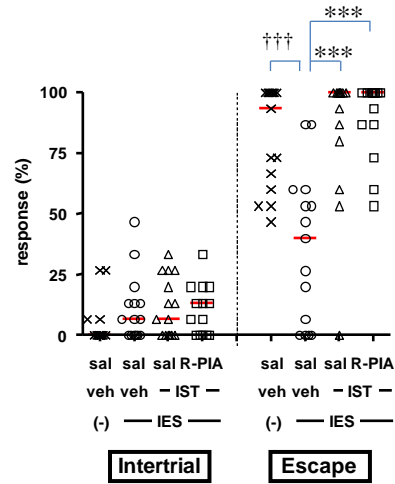
ER 障害に対するイストラデフィリン (1.25 mg/kg、経口投与) の改善作用は (Figure 12a: IES 負荷-溶媒対照群 0%; IES 負荷-イストラデフィリン投与群 53.3%, p=0.0007)、片側の側坐核に対する CGS21680 (20 µg/site) の注入により抑制された (Figure 12a: IES 負荷-イストラデフィリン/溶媒投与群 53.3%; IES 負荷-イストラデフィリン/CGS21680 投与群 0%, p=0.0001)。CGS21680 を注入したラットは、軽度の鎮静が見られたが、回避行動に影響を与えるような重篤な運動失調や筋弛緩は見られなかった。一方で、イストラデフィリン (1.25 mg/kg、p.o.) の ER 障害改善作用 (Figure 12b: IES 負荷-溶媒対照群 40.0%; IES 負荷-イストラデフィリン/溶媒投与群 100%, p=0.0006) は、片側の側坐核への R-PIA (5 µg/site) の注入では、明確な影響を受けなかった (Figure 12b: IES 負荷-イストラデフィリン/溶媒投与群 100%; IES 負荷-イストラデフィリン/R-PIA 投与群 100%, p=0.9853)。R-PIA を注入したラットは運動失調症状を示したが、回避行動に対する影響は見られなかった。

側坐核への注入と同様に、CGS21680 をカニューレーションにより室傍核、又は線条体 (尾状核-被殻) に注入したいずれの場合も、イストラデフィリン (1.25 mg/kg、経口投与) による ER 障害改善作用 (Figure 12c: IES 負荷-溶媒/溶媒投与群 13.3%; IES 負荷-イストラデフィリン投与群 80.0%, p=0.0053) (Figure 12d: IES 負荷-溶媒/溶媒投与群 40.0%; IES 負荷-イストラデフィリン投与群 100%, p=0.0008) が抑制された (Figure 12c: 室傍核: IES 負荷-イストラデフィリン/溶媒投与群 80.0%; IES 負荷-イストラデフィリン/CGS21680 投与群 6.7%, p=0.0076) (Figure 12d: 線条体: IES 負荷-イストラデフィリン/溶媒投与群 100%; IES 負荷-イストラデフィリン/CGS21680 投与群 10.0%, p=0.0359)。

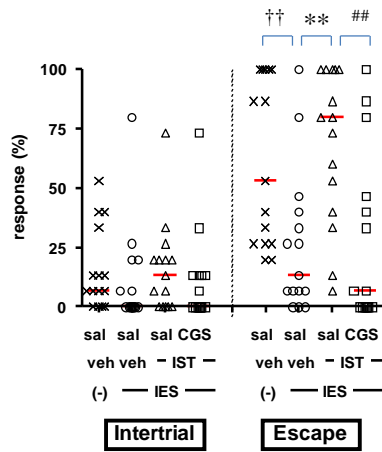
(a) CGS21680 (NAc)



(b) R-PIA (NAc)



(c) CGS21680 (PVN)



(d) CGS21680 (CPu)

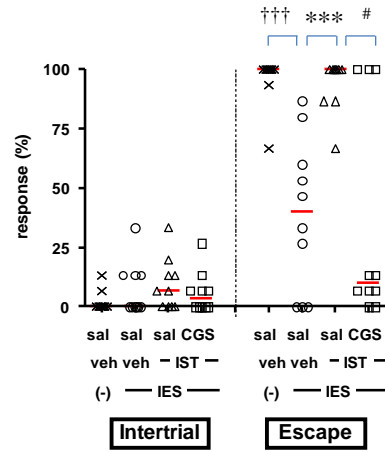
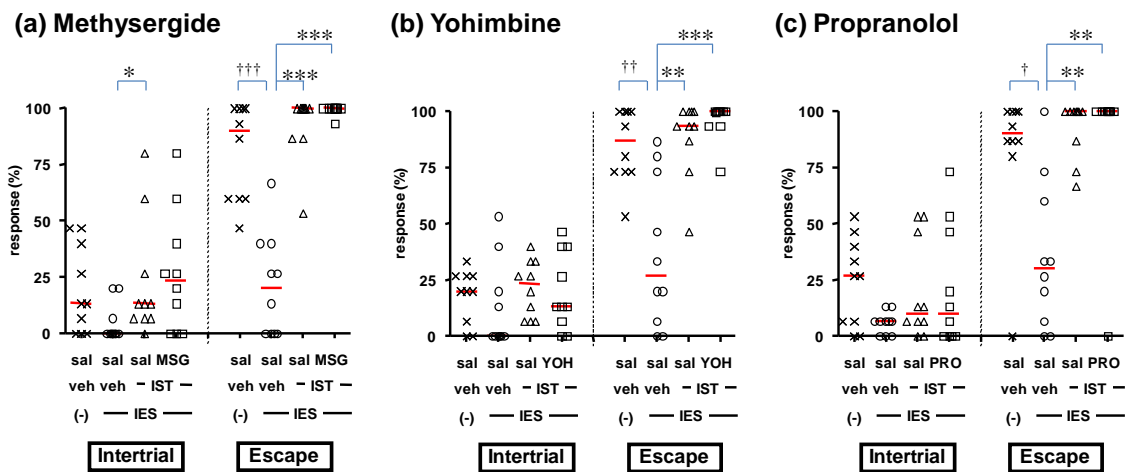


Figure 12. IES で惹起されるラットの LH 行動に対するイストラデフィリンの抗うつ様作用にアドノシン受容体作動薬が与える影響

ラットLHモデルにおいて、片側の側坐核 (NAc; a及びb)、室傍核 (PVN; c) 又は線条体 (CPu; d) に注入したA<sub>2A</sub>受容体作動薬CGS21680 (CGS、a、c及びd) 又はA<sub>1</sub>受容体作動薬R-PIA (b) が、経口投与したイストラデフィリン (IST、1.25 mg/kg) のFR-2セッションにおけるER (各グラフ右側) 又はFR-1セッションにおけるIR (各グラフ左側) への作用に与える影響。FR-2セッションにおけるERの障害はFR-1セッションのおよそ24時間前のIESストレスの負荷により惹起した。イストラデフィリン及びアドノシン受容体作動薬は、FR-1セッションの約1時間前及び30分前にそれぞれ投与した。グラフの点は各々のラットのER又はIR (%)、赤線は各群15匹 (a、b及びc) 又は10匹 (d) のラットの中央値を示す。†† p<0.01 及び††† p<0.001はIES非負荷群との比較を示す (Wilcoxon rank sum test)。\*\* p<0.01 及び\*\*\* p<0.001はIES負荷-溶媒/溶媒投与群との比較を示す (Steel-Dwass test)。# p<0.05, ## p<0.01 及び### p<0.001はIES負荷-イストラデフィリン/溶媒投与群との比較を示す (Steel-Dwass test)。

### 3.2.5 セロトニン又はアドレナリン受容体拮抗薬がイストラデフィリンの抗うつ様作用に与える影響

予備的な試験において、メチセルジド (5 mg/kg、腹腔内投与)、ヨヒンビン (3 mg/kg、腹腔内投与) 及びプロプラノロール (3 mg/kg、腹腔内投与) の単独投与は、IES 付加によるラットの ER 障害に対して、明確な影響を与えないことを確認した (データは未記載)。次に、これら 3 剤 (メチセルジド、ヨヒンビン又はプロプラノロール) がイストラデフィリン (1.25 mg/kg、経口投与) の抗うつ様作用 (Figure 13a: IES 負荷-溶媒/溶媒投与群 20.0%; IES 負荷-イストラデフィリン/溶媒投与群 100%,  $p=0.0007$ ) (Figure 13b: IES 負荷-溶媒/溶媒投与群 26.7%; IES 負荷-イストラデフィリン投与群 93.3%,  $p=0.0026$ ) (Figure 13c: IES 負荷-溶媒/溶媒投与群 30.0%; IES 負荷-イストラデフィリン投与群 100%,  $p=0.0029$ ) に与える影響を検討した。イストラデフィリンの作用に対し、メチセルジド (Figure 13a: IES 負荷-イストラデフィリン/溶媒投与群 100%; IES 負荷-イストラデフィリン/メチセルジド投与群 100%,  $p=0.9226$ )、ヨヒンビン (Figure 13b: IES 負荷-イストラデフィリン/溶媒投与群 93.3%; IES 負荷-イストラデフィリン/ヨヒンビン投与群 100%,  $p=0.3522$ ) 及び、プロプラノロール (Figure 13c: IES 負荷-イストラデフィリン/溶媒投与群 100%; IES 負荷-イストラデフィリン/プロプラノロール投与群 100%,  $p=0.6282$ ) は有意な影響を与えなかった。



**Figure 13. IES で惹起されるラットの LH 行動に対するイストラデフィリンの抗うつ様作用にセロトニン又はアドレナリン受容体拮抗薬が与える影響**

ラット LH モデルにおいて、腹腔内投与したメチセルジド (MSG、a)、ヨヒンビン (YOH、b) 又はプロプラノロール (PRO、c) が、経口投与したイストラデフィリン (IST、1.25 mg/kg) の FR-2 セッションにおける ER (各グラフ右側) 又は FR-1 セッションにおける IR (各グラフ左側) への作用に与える影響。FR-2 セッションにおける ER の障害は FR-1 セッションのおよそ 24 時間前の IES ストレスの負荷により惹起した。イストラデフィリン及び各々の受容体拮抗薬は、FR-1 セッションの約 1 時間前及び 30 分前にそれぞれ投与した。グラフの点は各々のラットの ER 又は IR (%)、赤線は各群 10 匹の中央値を示す。† p<0.05, †† p<0.01 及び ††† p<0.001 は IES 非負荷群との比較を示す (Wilcoxon rank sum test)。\* p<0.05, \*\* p<0.01 及び \*\*\* p<0.001 は IES 負荷-溶媒/溶媒投与群との比較を示す (Steel-Dwass test)。



### 3.3 考察

第2章ではげっ歯類のFSTやTSTを用いて、アデノシンA<sub>2A</sub>受容体の遮断により抗うつ様の作用が見られる事を明らかにした。第3章ではLH試験を用いて、A<sub>2A</sub>受容体とうつ症状の関係について更に詳細に検討した。

LH試験は、うつ症状に対する動物モデルとして汎用されている。予測不可能かつ不可避なストレスに暴露されたLHラットは、運動量の低下、体重の減少、睡眠の質の変化、モチベーションの低下、及び、ストレス関連ホルモンの増加等、うつ病患者に類似の症状を示すことが報告されており、LH試験は優れた表面妥当性を持つと考えられている<sup>45, 60)</sup>。また、LHラットに認められるこれらの症状は、患者で抗うつ作用を示す多種多様な薬剤により改善することから、LH試験は高い予測妥当性も有していると思われる<sup>44, 45, 48, 59)</sup>。本研究においても、他グループからの報告と同様に、陽性対照薬として用いたTCAのデシプラミン又はSSRIのフルオキセチンを慢性的に投与することにより、LHラットの回避行動に対する障害が改善した<sup>59, 62)</sup>。これらの結果から、A<sub>2A</sub>受容体とうつ症状の関係の評価、及びA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬のヒトでの潜在的な有効性の予測のために、ラットLH試験が有用な評価系であると考えられた。

イストラデフィリンは単回投与、及び2週間の反復投与によって、ERの障害を改善した。また、単回投与での作用強度は上記の陽性対照化合物を慢性的に投与した場合とほぼ同等であった。一般的なTCA及びSSRI等の場合、ヒトにおけるうつ症状の改善には数週間の反復投与が必要であることが知られている。一方で、今回の試験の結果は、既存の抗うつ薬のような遅発性の作用メカニズムとは異なり、A<sub>2A</sub>受容体遮断の結果、即効性のメカニズムによりうつ症状を改善する可能性を示唆している。更にイストラデフィリンは2週間の反復投与による作用の減弱が見られなかったことから、A<sub>2A</sub>受容体遮断による抗うつ様効果には耐性が発現し難いことが示唆される。しかし、耐性の発現に関しては、更に長期間の反復投与試験が必要と考えられる。

ドパミンD<sub>2</sub>様受容体作動薬であるキンピロールを単回投与したところ、LHラットのIESによるERの低下は顕著に抑制された。しかし、同時にキンピロールはIRを有意に増加させたことから、そのERに対する作用は神経興奮作用<sup>61)</sup>に起因する運動量亢進による擬陽性であることが否定できない。一方で、イストラデフィリンは、IRに明確な影響を与えずIESによるERの障害

のみを改善した。このことから、D<sub>2</sub>様受容体の活性化によるものとは異なり、A<sub>2A</sub>受容体遮断によるERの障害に対する抑制は、うつ症状に対する選択的な作用を反映していると考えられる。

キサントシン骨格を持つ選択的なアデノシンA<sub>1</sub>受容体拮抗薬であるDPCPXは<sup>63)</sup>、正常動物の痛覚関連行動にA<sub>1</sub>受容体依存的なメカニズムで影響を与えることが報告されている用量域において<sup>63)</sup>、LHラットのER障害を改善しなかった。この結果は、イストラデフィリンの抗うつ様活性にA<sub>1</sub>受容体拮抗活性が関連していないことを示唆している。一方で、サブタイプ間に選択性のないアデノシン受容体拮抗薬であるテオフィリン、及び、A<sub>1</sub>受容体とA<sub>2A</sub>受容体間の選択性がイストラデフィリンより低いA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬であるCGS15943<sup>64, 65)</sup>は共に、LHラットのER障害を部分的に改善した。これらの結果も、A<sub>2A</sub>受容体の遮断によりうつ症状が改善することに矛盾しない。しかし、選択性の高いA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬であるCSC<sup>66)</sup>を経口投与したところ、LHラットのER障害は改善しなかった。Minorらは、IESを負荷したラットのERの障害が、サブタイプ間非選択的アデノシン受容体拮抗薬であるカフェイン、又はCSC (0.5-5 mg/kg) の腹腔内投与により改善することを報告している<sup>67)</sup>。彼らの報告と本研究とのCSCの作用に関する矛盾の原因は不明であるが、投与経路が異なることから、本研究においてはCSCの脳内濃度が不十分であった可能性等が考えられる。

アデノシン類縁体の脳室内投与<sup>68)</sup>、細胞外のアデノシン分解を抑制する薬剤<sup>69)</sup>、又は核酸トランスポーター阻害剤<sup>70)</sup>による脳内のアデノシンシグナルの増強が、単独ではERの障害を惹起しない閾値下強度のIESストレスと相乗的な効果を示し、ERの障害を引き起こすことが既に報告されている。本研究では、選択的なA<sub>2A</sub>受容体作動薬であるCGS21680を正常ラットの片側又は両側の側坐核に注入することにより、IESストレス負荷と同様のER障害が惹起されることを示した。これらの結果は、側坐核におけるA<sub>2A</sub>受容体の活性化がERの障害の確立、すなわちうつ症状の発現に重要であることを示している。片側の注入のみでERの障害が惹起されたことから、次に、イストラデフィリンによるLH状態の改善作用に対する片側の側坐核へのCGS21680の注入が与える影響を検討したところ、イストラデフィリンの作用はCGS21680によりほぼ完全に消失した。これとは対照的に、同様に側坐核に注入したA<sub>1</sub>受容体拮抗薬R-PIAはイストラデフィリンの作用を抑制しなかった。したがって、LHラットにおけるイストラデ

フィリンの抗うつ様作用は、 $A_1$ 受容体ではなく $A_{2A}$ 受容体拮抗作用に依存することが確認された。

次に、側坐核以外の領域の $A_{2A}$ 受容体のLHラットのうつ症状への関与の有無を明らかにするため、 $A_{2A}$ 受容体の脳内分布<sup>70)</sup>及び脳内各領域のうつへの関与についての一般的な情報<sup>71, 72)</sup>から、視床下部の室傍核及び線条体（尾状核-被殻）をその候補部位に選んで検討した。しかし、いずれの部位に $A_{2A}$ 受容体作動薬を注入した場合も、イストラデフィリンのLHに対する作用は抑制された。したがって、本研究では、うつ症状に関与する $A_{2A}$ 受容体の脳内における存在部位については、明確な結論を示せなかった。IES負荷したラットに対し $A_{2A}$ 受容体拮抗薬を局所的に投与することにより、更に有用な情報が得られるかもしれない。

うつ症状の抑制に関して、 $A_{2A}$ 受容体の遮断の下流のメカニズムについては、現在のところほとんど明らかではない。脳内において $A_{2A}$ 受容体は $D_2$ 様受容体と共発現しヘテロダイマーを構成し互いに負に調節し合っているとの説があり<sup>65)</sup>、また、 $D_2$ 様受容体作動薬であるプラミペキソールがヒトにおいてうつ症状を改善することが報告されている<sup>73, 74)</sup>。更に、げっ歯類における労力に対する報酬の効果の評価系effort-related choiceはヒトにおけるうつ症状と類似の精神運動性遅延を反映することが知られており、effort-related choiceに対する $D_2$ 様受容体拮抗薬ハロペリドールの作用は $A_{2A}$ 受容体拮抗薬であるMSX-3により抑制される<sup>75)</sup>。これらのことから、 $A_{2A}$ 受容体遮断の結果生じる薬理作用は $D_2$ 様受容体の機能修飾を介して発現する可能性がある。しかし一方で、少なくとも $A_{2A}$ 受容体拮抗薬の抗パーキンソン病活性は $D_2$ 様受容体に非依存的であることから<sup>76)</sup>、生体内において $D_2$ 様受容体を介したシグナルとは独立した $A_{2A}$ 受容体を介した神経伝達が存在することも明らかになっている。また、本研究でのラットFSTを用いた評価において、イストラデフィリンによる抗うつ様作用はコルチコステロンで抑制されるのに対しキンピロールによる抗うつ様作用は抑制されない等、 $A_{2A}$ 受容体拮抗薬と $D_2$ 様受容体作動薬の抗うつ様作用の間には質的な相違があることが明らかになったことから、 $A_{2A}$ 受容体遮断による抗うつ様作用の発現には $D_2$ 様受容体は関与していないと考えられる。

TCA、SSRI及びSNRI等ほとんどすべての既存の抗うつ薬は、患者のうつ症状に対して、ノルアドレナリン又はセロトニンの輸送体の機能修飾を介して抗うつ作用を発現すると考えられている<sup>4)</sup>。また、うつ症状のモデル動物においては、抗うつ様作用を示す薬剤の多くが、これらの神経伝達への作用により薬効を発現することが明らかになっている<sup>45)</sup>。したがって、モ

デル動物における各種薬剤の抗うつ様作用は、5-HT<sub>2A/2C</sub>受容体拮抗薬メチセルジド、 $\alpha_2$ アドレナリン受容体拮抗薬ヨヒンビン、又は $\beta$ 受容体拮抗薬プロプラノロール等によって影響を受けることが予想される。そこで、これらの拮抗薬がイストラデフィリンの抗うつ様作用に与える影響を検討したが、いずれの化合物も明確な作用を示さなかった。うつ症状に関与するノルアドレナリン及びセロトニンによる神経伝達には上記以外にも 5-HT<sub>1A</sub>受容体等様々な受容体が関与していることから、これら 3 種の拮抗薬のみの評価では、A<sub>2A</sub>受容体遮断による抗うつ作用とこれらの神経伝達物質の関係を解明するには不十分である。詳細なメカニズム解析には、異なる作用プロファイルを持つ多様な薬剤を用いた薬理的評価が必要と考えられる。

### 3.4 小括

げっ歯類を用いた予測妥当性の高いうつ病モデルであるラットLH試験において、A<sub>2A</sub>受容体遮断によりうつ様症状が改善した。また、側坐核のA<sub>2A</sub>受容体の活性化によりうつ様症状が惹起された。更に、A<sub>2A</sub>受容体遮断によるうつ様症状の改善作用は、セロトニンやアドレナリン作動性神経伝達への直接的な影響は考えにくく、既存の抗うつ薬とは異なることが示唆された。

## 総括

*In vitro*受容体プロファイルの結果から、イストラデフィリンが、強力で選択的かつ競合的なアデノシンA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬であり、既存の抗うつ薬が作用する神経伝達物質の受容体及び輸送体、並びにモノアミン代謝酵素等に影響を与えないことを明らかとした（第1章）。次に、A<sub>2A</sub>受容体とうつ症状の関係を調べる為、イストラデフィリンを主な評価ツールとし、うつ病モデル動物を用いた行動薬理的な手法を用いて検討した。うつ症状を評価する動物モデルの多くは認知機能や運動量等の影響を受けるため、擬陽性を慎重に見極める必要があるが、本研究では評価したFST、TST及びLHの3つの系のいずれにおいても、イストラデフィリンによるA<sub>2A</sub>受容体の選択的遮断により抗うつ様の作用が発現した（第2章及び3章）。したがって、結果の信頼性は高いと考えられる。

既存の抗うつ薬の多くは、患者のうつ症状に対して、モノアミン神経伝達物質の輸送体の機能修飾を介して抗うつ作用を発現すると考えられている<sup>4)</sup>。しかし、本研究で評価ツールとして用いたイストラデフィリンはこれらのいずれの輸送体に対しても親和性を持たなかった（第1章）。また、FST又はTSTを用いた評価において、共に閾値下用量のイストラデフィリンと既存の抗うつ薬（SSRI、SNRI又はMAO-B阻害剤）の併用により、有意な抗うつ様作用を示した（第2章）。更に、LH試験におけるイストラデフィリンの抗うつ様作用は、既存の多くの抗うつ薬とは異なり、セロトニン受容体及びノルアドレナリン受容体拮抗薬の影響を受けなかった（第3章）。したがって、うつ症状に影響を与える多くの薬剤の作用とは異なり、A<sub>2A</sub>受容体を介したうつ症状の制御は、セロトニン又はノルアドレナリン神経系の伝達に依存しないことが示唆された。

一方で、A<sub>2A</sub>受容体拮抗薬による抗うつ様作用の少なくとも一部は、HPA軸の直接的又は間接的な調節に起因する可能性があることを明らかにした（第2章）。TCA及びSSRIの抗うつ作用の発現にはHPA軸の間接的な調節が重要な役割を果たしていることが知られている<sup>51-53)</sup>。しかし、上記のようにセロトニンやアドレナリン作動性神経伝達の関与に関しては、A<sub>2A</sub>受容体拮抗薬と既存の抗うつ薬では根本的に異なることが示唆されたことから、今後、HPA軸とA<sub>2A</sub>受容体との関係に焦点を当てた薬理的、及び分子的アプローチが必要であると考えられる。

A<sub>2A</sub>受容体拮抗薬は、大脳基底核回路の制御を介して運動機能を調節することから、パーキンソン病における運動症状の改善薬として注目されており<sup>21-23)</sup>、2013年本邦においてイストラデフィリンが新規のパーキンソン病治療薬（レボドパ含有製剤で治療中のパーキンソン病患者におけるwearing-off現象の改善に対する適応）として承認された。今後、イストラデフィリンの臨床使用データが蓄積され、うつ症状に対する副次的な作用が解析されることにより、A<sub>2A</sub>受容体とうつ症状の関係が更に明らかになっていくと思われる。一方で、大うつ病の患者の10~20%は既存の抗うつ薬に全く反応しない難治性であり、また、約50%の患者も既存の療法で十分に改善するとは言い難い<sup>77, 78)</sup>。ほとんどの既存の抗うつ薬は、セロトニンやノルアドレナリン神経伝達に作用することによって抗うつ作用を発現していることから、それ以外の作用メカニズムを持つ薬剤は現状治療抵抗性である患者層に有効である可能性があり、その開発が望まれている。本研究では、A<sub>2A</sub>受容体を遮断することにより抗うつ作用が発現することを示した。A<sub>2A</sub>受容体とうつ症状の関係の更なる詳細な解析により、うつ病に対する新たなアプローチが生まれる可能性がある。

## 結論

げっ歯類を用いたうつ症状の代表的な評価系であるFST、TST及びLH試験において、A<sub>2A</sub>受容体遮断によりうつ様症状が改善することを明らかにした。これらの評価系でのA<sub>2A</sub>受容体遮断による抗うつ様作用の強度は既存の至適用量・用法の抗うつ薬とほぼ同等であった。また、A<sub>2A</sub>受容体拮抗薬の抗うつ様作用は単回投与でも明確であったことから、うつ病患者における薬効発現に数週間を要する既存の抗うつ薬と異なり、A<sub>2A</sub>受容体拮抗薬は即効性の抗うつ薬となる可能性が示唆された。

A<sub>2A</sub>受容体作動薬又は拮抗薬を脳内に局所投与した結果から、側坐核のA<sub>2A</sub>受容体の制御がうつ様症状に重要な影響を与えていると考えられたが、室傍核又は線条体等の受容体についても関与している可能性は否定されない。また、コルチコステロンによる抑制効果から、A<sub>2A</sub>受容体拮抗薬の抗うつ様作用の少なくとも一部には、ストレス応答に重要な役割を果たすHPA軸への作用が関与していることが示唆された。加えて、A<sub>2A</sub>受容体拮抗薬による抗うつ様作用はA<sub>2A</sub>受容体とD<sub>2</sub>受容体の相互作用に非依存的であることが示唆され、更に、セロトニン又はノ

ルアドレナリン等のモノアミン神経伝達を修飾すると考えられる既存の抗うつ薬とは異なることが示された。

## 謝辞

本学位論文の作成にあたり、終始懇切なるご指導ご助言を賜りました静岡県立大学 薬学研究院 薬理学教室 教授 石川智久先生に、心より感謝申し上げます。また、ご高覧と親身なるご助言を頂きました薬学研究院 医薬品情報解析学教室 教授 山田浩先生、薬学研究院 統合生理学教室 教授 武田厚司先生、及び薬学研究院 創薬探索センター 教授 浅井章良先生に、心より感謝申し上げます。

本研究を行う機会を賜り、また、終始ご指導ご助言を賜りました協和発酵キリン株式会社、神田知之博士、塩崎静男さん、小林実さん、佐木真由美さん、太田照子さんに、心より感謝申し上げます。

最後に、本研究に対して、鼓舞、激励を頂きました諸先輩ならびに同僚の皆様、そして日々の惜しみない援助、協力をしてくれた家族に感謝致します。



## 参考文献

1. 川上 憲人ほか：“地域住民における心の健康問題と対策基盤の実態に関する研究：3 地区の総合解析結果”平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）心の健康問題と対策基盤の実態に関する研究 分担研究報告書：1, 2003 年.
2. 厚生労働省：患者調査上巻第 64 表 総患者数, 性・年齢階級×疾病小分類別 2008 年, <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001060228> 参照.
3. 厚生労働省：患者調査上巻第 63 表 総患者数, 性・年齢階級×疾病小分類別 2014 年, [http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/GL08020103.do?\\_toGL08020103\\_&listID=000001141596&requestSender=dsearch](http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/GL08020103.do?_toGL08020103_&listID=000001141596&requestSender=dsearch) 参照.
4. 岡田尊司：うつと気分障害. 幻冬舎. 2010 年.
5. 樋口 輝彦 編著：うつ病の病理－脳科学研究の成果－. 新興医学出版. 2001 年.
6. Sebastião AM, Ribeiro JA. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:341-6.
7. Olah ME, Stiles GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995;35:581-606.
8. Ciruela F, Albergaria C, Soriano A, Cuffi L, Carbonell L, Sanchez S, Gandia J, Fernandez-Duenas V. Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): Behind the biology of adenosine signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1798:9-20.
9. El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Bertorelli R, Ongini E, Costentin J, Vaugeois JM. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A<sub>2A</sub> receptor knockout mice. *Br J Pharmacol.* 2001;134:68-77.
10. El Yacoubi M, Costentin J, Vaugeois JM. Adenosine A<sub>2A</sub> receptors and depression. *Neurology.* 2003;61(11 Suppl 6):S82-7.
11. Klotz KN. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;362:382-91.

12. Shimada J, Koike N, Nonaka H, Shiozaki S, Yanagawa K, Kanda T, Kobayashi H, Ichimura M, Nakamura J, Kase H, Suzuki F. Adenosine A<sub>2A</sub> antagonists with potent anti-cataleptic activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 1997;7:2349-2352.
13. Shiozaki S, Ichikawa S, Nakamura J, Kitamura S, Yamada K, Kuwana Y. Actions of adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999;147:90-5.
14. Koga K, Kurokawa M, Ochi M, Nakamura J, Kuwana Y. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists KF17837 and KW-6002 potentiate rotation induced by dopaminergic drugs in hemi-Parkinsonian rats. *Eur J Pharmacol*. 2000;408:249-55.
15. 野元 正弘. コモン・マーモセット(小型のサル)の薬理学研究への応用. *日薬理誌*. 1995;106:11-8
16. Kanda T, Jackson MJ, Smith LA, Pearce RK, Nakamura J, Kase H, Kuwana Y, Jenner P. Adenosine A<sub>2A</sub> antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. *Ann Neurol*. 1998;43:507-13.
17. Kanda T, Jackson MJ, Smith LA, Pearce RK, Nakamura J, Kase H, Kuwana Y, Jenner P. Combined use of the adenosine A<sub>2A</sub> antagonist KW-6002 with L-DOPA or with selective D1 or D2 dopamine agonists increases antiparkinsonian activity but not dyskinesia in MPTP-treated monkeys. *Exp Neurol*. 2000;162:321-7.
18. DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*. 1990;13:281-5.
19. 水野 美邦 編著. EBM のコンセプトを取り入れたパーキンソン病ハンドブック. 中外医学社. 1991年 : p27-36.
20. Mori A, Shindou T. Modulation of GABAergic transmission in the striatopallidal system by adenosine A<sub>2A</sub> receptors: a potential mechanism for the antiparkinsonian effects of A<sub>2A</sub> antagonists. *Neurology*. 2003;61(11 Suppl 6):S44-8.
21. Jenner P, Mori A, Hauser R, Morelli M, Fredholm BB, Chen JF. Adenosine, adenosine A<sub>2A</sub> antagonists, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009;15:406-13.

22. Mizuno Y, Hasegawa K, Kondo T, Kuno S, Yamamoto M; Japanese Istradefylline Study Group. Clinical efficacy of istradefylline (KW-6002) in Parkinson's disease: a randomized, controlled study. *Mov Disord.* 2010;25:1437-43.
23. Mizuno Y, Kondo T; Japanese Istradefylline Study Group. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist istradefylline reduces daily OFF time in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013;28:1138-41.
24. Armentero MT, Pinna A, Ferre S, Lanciego JL, Muller CE, Franco R. Past, present and future of A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease. *Pharmacol Ther.* 2011;132:280-99.
25. Shimada J, Suzuki F, Nonaka H, Ishii A, Ichikawa S. (E)-1,3-dialkyl-7-methyl-8-(3,4,5-trimethoxystyryl)xanthines: potent and selective adenosine A<sub>2</sub> antagonists. *J Med Chem.* 1992;35:2342-2345.
26. Hayashi N, Kinemuchi H, Kamijo K. Effect of tris (hydroxymethyl) aminomethane on amine oxidase activity in dog brain, liver and serum and in human placenta. *Jpn J Pharmacol.* 1981;31:737-46.
27. Nikodejevic B, Senoh S, Daly JW, Creveling CR. Catechol-*O*-methyltransferase. II. A new class of inhibitors of catechol-*o*-methyltransferase; 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzoic acid and related compounds. *J Pharmacol Exp Ther.* 1970;174:83-93.
28. Hide I, Padgett WL, Jacobson KA, Daly JW. A<sub>2A</sub> adenosine receptors from rat striatum and rat pheochromocytoma PC12 cells: characterization with radioligand binding and by activation of adenylate cyclase. *Mol Pharmacol.* 1992;41:352-9.
29. Arunlakshana O, Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother.* 1959;14:48-58.
30. Antonini A, Poewe W. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists in Parkinson's disease: still in the running. *Lancet Neurol.* 2014;13:748-9.
31. Neustadt BR, Hao J, Lindo N, Greenlee WJ, Stamford AW, Tulshian D, Ongini E, Hunter J, Monopoli A, Bertorelli R, Foster C, Arik L, Lachowicz J, Ng K, Feng KI. Potent, selective, and orally active adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists: arylpiperazine derivatives of pyrazolo[4,3-*e*]-1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pyrimidines. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;17:1376-80.

32. Black KJ, Koller JM, Campbell MC, Gusnard DA, Bandak SI. Quantification of indirect pathway inhibition by the adenosine A<sub>2a</sub> antagonist SYN115 in Parkinson disease. *J Neurosci.* 2010;30:16284-92
33. Hodgson RA, Bedard PJ, Varty GB, Kazdoba TM, Di Paolo T, Grzelak ME, Pond AJ, Hadjtahar A, Belanger N, Gregoire L, Dare A, Neustadt BR, Stamford AW, Hunter JC. Preladenant, a selective A<sub>2A</sub> receptor antagonist, is active in primate models of movement disorders. *Exp Neurol.* 2010;225:384-90.
34. Brooks DJ, Doder M, Osman S, Luthra SK, Hirani E, Hume S, Kase H, Kilborn J, Martindill S, Mori A. Positron emission tomography analysis of [<sup>11</sup>C]KW-6002 binding to human and rat adenosine A<sub>2A</sub> receptors in the brain. *Synapse.* 2008;62:671-81.
35. Baune BT, Hohoff C, Berger K, Neumann A, Mortensen S, Roehrs T, Deckert J, Arolt V, Domschke K. Association of the COMT val158met variant with antidepressant treatment response in major depression. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33:924-32.
36. Castagnoli N Jr, Petzer JP, Steyn S, Castagnoli K, Chen JF, Schwarzschild MA, Van der Schyf CJ. Monoamine oxidase B inhibition and neuroprotection: studies on selective adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists. *Neurology.* 2003;61(11 Suppl 6):S62-8.
37. Zhu J, Mix E, Winblad B. The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system. *CNS Drug Rev.* 2001;7:387-98.
38. Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S252-7.
39. Belardinelli L, Shryock JC, Ruble J, Monopoli A, Dionisotti S, Ongini E, Dennis DM, Baker SP. Binding of the novel nonxanthine A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonist [<sup>3</sup>H]SCH58261 to coronary artery membranes. *Circ Res.* 1996;79:1153-1160.
40. Kobayashi S, Conforti L, Pun RY, Millhorn DE. Adenosine modulates hypoxia-induced responses in rat PC12 cells via the A<sub>2A</sub> receptor. *J Physiol.* 1998;508 (Pt 1):95-107.
41. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977;266:730-2.

42. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1977;229:327-36.
43. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1985;85:367-70.
44. Yan HC, Cao X, Das M, Zhu XH, Gao TM. Behavioral animal models of depression. *Neurosci Bull.* 2010;26:327-37.
45. Duman CH. Models of depression. *Vitam Horm.* 2010;82:1-21.
46. Kennett GA, Dourish CT, Curzon G. Antidepressant-like action of 5-HT<sub>1A</sub> agonists and conventional antidepressants in an animal model of depression. *Eur J Pharmacol.* 1987;134:265-74.
47. Schreiber R, De Vry J. Neuroanatomical basis for the antidepressant-like effects of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists 8-OH-DPAT and ipsapirone in the rat forced swimming test. *Behav Pharmacol.* 1993;4:625-636.
48. Deussing JM Animal models of depression *Drug discovery Today: Disease models* 2006;3:375-383.
49. Kitamura Y, Araki H, Gomita Y. Influence of ACTH on the effects of imipramine, desipramine and lithium on duration of immobility of rats in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;71:63-9.
50. Iijima M, Ito A, Kurosu S, Chaki S. Pharmacological characterization of repeated corticosterone injection-induced depression model in rats. *Brain Res.* 2010;1359:75-80.
51. Reul JM, Stec I, Soder M, Holsboer F. Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Endocrinology.* 1993;133:312-20.
52. Reul JM, Labeur MS, Grigoriadis DE, De Souza EB, Holsboer F. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis changes in the rat after long-term treatment with the reversible monoamine oxidase-A inhibitor moclobemide. *Neuroendocrinology.* 1994;60:509-19.
53. Pariante CM, Miller AH. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry.* 2001;49:391-404.

54. Jahn H, Schick M, Kiefer F, Kellner M, Yassouridis A, Wiedemann K. Metyrapone as additive treatment in major depression: a double-blind and placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61:1235-44.
55. Flores BH, Kenna H, Keller J, Solvason HB, Schatzberg AF. Clinical and biological effects of mifepristone treatment for psychotic depression. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:628-36.
56. D'Aquila PS, Collu M, Pani L, Gessa GL, Serra G. Antidepressant-like effect of selective dopamine D<sub>1</sub> receptor agonists in the behavioural despair animal model of depression. *Eur J Pharmacol*. 1994;262:107-11.
57. Mendlewicz J, Youdim MB. L-Deprenil, a selective monoamine oxidase type B inhibitor, in the treatment of depression: a double blind evaluation. *Br J Psychiatry*. 1983;142:508-11.
58. Sternbach H. The serotonin syndrome. *Am J Psychiatry*. 1991;148:705-13.
59. Sherman AD, Sacquitne JL, Petty F. Specificity of the learned helplessness model of depression. *Pharmacol Biochem Behav*. 1982;16:449-54.
60. Willner P. Animal models as simulations of depression. *Trends Pharmacol Sci*. 1991;12:131-6.
61. Geoffroy M, Christensen AV. Psychomotor stimulants versus antidepressants in the learned helplessness model of depression. *Drug Dev. Res*. 1993;19:48-55.
62. Gambarana C, Ghiglieri O, Taddei I, Tagliamonte A, De Montis MG. Imipramine and fluoxetine prevent the stress-induced escape deficits in rats through a distinct mechanism of action. *Behav Pharmacol*. 1995;6:66-73.
63. Gong QJ, Li YY, Xin WJ, Wei XH, Cui Y, Wang J, Liu Y, Liu CC, Li YY, Liu XG. Differential effects of adenosine A<sub>1</sub> receptor on pain-related behavior in normal and nerve-injured rats. *Brain Res*. 2010;1361:23-30.
64. Williams M, Francis J, Ghai G, Braunwalder A, Psychoyos S, Stone GA, Cash WD. Biochemical characterization of the triazoloquinazoline, CGS 15943, a novel, non-xanthine adenosine antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;241:415-20.
65. Ongini E, Dionisotti S, Gessi S, Irenius E, Fredholm BB. Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1999;359:7-10.

66. Jacobson KA, Nikodijević O, Padgett WL, Gallo-Rodriguez C, Maillard M, Daly JW. 8-(3-Chlorostyryl)caffeine (CSC) is a selective A<sub>2</sub>-adenosine antagonist in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* 1993;323:141-4.
67. Minor TR, Rowe MK, Soames Job RF, Ferguson EC. Escape deficits induced by inescapable shock and metabolic stress are reversed by adenosine receptor antagonists. *Behav Brain Res.* 2001;120:203-12.
68. Minor TR, Chang WC, Winslow JL. Stress and adenosine: I. Effect of methylxanthine and amphetamine stimulants on learned helplessness in rats. *Behav Neurosci.* 1994;108:254-64.
69. Woodson JC, Minor TR, Job RF. Inhibition of adenosine deaminase by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) mimics the effect of inescapable shock on escape learning in rats. *Behav Neurosci.* 1998;112:399-409.
70. Minor TR, Rowe M, Cullen PK, Furst S. Enhancing brain adenosine signaling with the nucleoside transport blocker NBTI (S-(4-nitrobenzyl)-6-theoinosine) mimics the effects of inescapable shock on later shuttle-escape performance in rats. *Behav Neurosci.* 2008;122:1236-47.
71. Furuyashiki T, Deguchi Y. Roles of altered striatal function in major depression. *Brain Nerve.* 2012;64:919-26.
72. Levy BH, Tasker JG. Synaptic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress. *Front Cell Neurosci.* 2012;6:1-13.
73. Zarate CA Jr, Payne JL, Singh J, Quiroz JA, Luckenbaugh DA, Denicoff KD, Charney DS, Manji HK. Pramipexole for bipolar II depression: a placebo-controlled proof of concept study. *Biol Psychiatry.* 2004;56:54-60.
74. Kano O, Ikeda K, Kiyozuka T, Iwamoto K, Ito H, Kawase Y, Sato R, Fujioka T, Araki Y, Baba S, Iwasaki Y. Beneficial effect of pramipexole for motor function and depression in Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008;4:707-10.
75. Farrar AM, Pereira M, Velasco F, Hockemeyer J, Muller CE, Salamone JD. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonism reverses the effects of dopamine receptor antagonism on instrumental output

and effort-related choice in the rat: implications for studies of psychomotor slowing. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007;191:579-86.

76. Aoyama S, Kase H, Borrelli E. Rescue of locomotor impairment in dopamine D<sub>2</sub> receptor-deficient mice by an adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist. *J Neurosci*. 2000;20:5848-52.
77. Fava M. Augmentation and combination strategies in treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry*. 2001;62:4-11.
78. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002;34:13-25.