

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07501

研究課題名（和文）ドラッグ・リポジショニングによるLPA1受容体を標的とした新規抗うつ薬の開発

研究課題名（英文）Development of a novel antidepressant targeting the LPA1 receptor by drug repositioning

研究代表者

梶谷 直人 (Kajitani, Naoto)

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特任助教

研究者番号：60755742

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、リゾホスファチジン酸（LPA）1受容体を介した抗うつ効果のシグナル伝達メカニズムを解明し、既存薬からLPA1受容体アゴニストを同定し、抗うつ治療薬としての可能性を探ることを目的とした。  
Gタンパク質バイアス型LPA1受容体アゴニストが抗うつ効果において重要であることを明らかにした。約1600の化合物から段階的なスクリーニングを行い、候補化合物の絞り込みを行い、これらの中から特に活性が高いLPA1受容体アゴニストを特定したが、明らかなバイアス型アゴニストは未だ見つかっていない。今後、化合物の数を増やし、さらなる探索を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LPA1受容体シグナルに関しては「うつ病様行動を促進する報告」と「抗うつ効果を示す報告」の相反する報告がなされており、その原因は不明であった。本研究で、同じLPA1受容体でも下流シグナルのバイアスにより相反する行動が誘導されることを世界で初めて証明し、過去の報告の矛盾を説明するシグナルメカニズムを提唱することができた。  
LPA1受容体アゴニストは、これまで内因性リガンドであるLPAの構造類似体しかなかった。今回の既存薬からのスクリーニングを行ったことで、低分子化合物にもLPA1受容体アゴニストが存在することが明らかとなった。今後LPA1受容体アゴニストを合成する際に非常に重要なデータとなる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research was to elucidate the signaling mechanism of lysophosphatidic acid (LPA) 1 receptor-mediated antidepressant effect, to identify LPA1 receptor agonists from existing drugs, and to explore their potential as antidepressant drugs. We have shown that G protein-biased LPA1 receptor agonists are important for antidepressant activity. Through a stepwise screening of approximately 1600 compounds, we have narrowed down the candidates and identified highly active LPA1 receptor agonists; however, we have not yet found an unambiguously biased agonist. In the future, we plan to increase the number of compounds and continue further exploration.

研究分野：精神神経科学

キーワード：ドラッグリポジショニング 抗うつ薬

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在日本で使用されている抗うつ薬は、三環系抗うつ薬 (TCA) をプロトタイプとして開発され、モノアミン神経系の活性化に着目されている。臨床で主に使用される SSRI はモノアミン作用に特異性を高め、プロトタイプに比べ副作用が少なく使いやすいとされる。しかし、重症例においては SSRI よりも TCA の方が治療効果が高いとする報告や、双極症における TCA の躁転リスクの高さから、TCA にはモノアミン以外の薬理作用が関与している可能性が示唆されている。これまでの研究で、TCA がリゾホスファチジン酸 (LPA) 1 受容体を活性化し抗うつ効果に寄与する可能性が明らかになっている。興味深いことに、SSRI には LPA1 受容体活性化作用が認められない。したがって、LPA1 受容体作動薬は、従来のモノアミン作用とは異なる薬理作用を持つ新規抗うつ薬の候補となる可能性を示している。

### 2. 研究の目的

本研究では、培養細胞を用いたシグナルメカニズムの解析とマウス行動実験を通じて、LPA1 受容体の抗うつ効果への関与を詳細に検討することを目的の 1 つとする。既知の LPA1 受容体活性化化合物は、内因性リガンドである LPA の構造類似体であり、末梢から投与された場合には分解されやすく、脳への移行が困難である。これらを出発点として、LPA1 受容体特異的な作動薬を合成することは難しいとされている。近年、既存薬から新たな薬理作用を見出し、他の疾患への適応拡大を図るドラッグ・リポジショニングが注目されている。本研究では、得られた成果を基礎研究に留めず、臨床への応用を目指し、ドラッグ・リポジショニングによって既存薬から LPA1 受容体作動薬を探索することを 2 つ目の目的とした。

### 3. 研究の方法

培養細胞を用いた LPA1 受容体下流シグナルの検討

- TGF $\alpha$  shedding assay  
LPA1 受容体活性化によって引き起こされる G タンパク質の活性を特異的に検出する実験系。ほぼ全ての GPCR を同じアッセイ系で高感度かつ高精度に検出することが可能なアッセイ。LPA1-6 の全ての受容体活性を特異的に評価できる。
- NanoBit  $\beta$ -arrestin recruitment assay  
LPA1 受容体と  $\beta$ -arrestin の結合を特異的に評価するアッセイ。GPCR 活性の評価に使われる代表的な指標の一つである。
- Real time PCR  
HEK293A 細胞を使用。HEK293A 細胞には内因性の LPA1 受容体が発現しており、LPA1 受容体シグナル依存的に増加する遺伝子発現変化を real time PCR 法で評価した。

LPA1 受容体アゴニストによる抗うつ効果の検討

- LPA1 受容体アゴニストは海馬に直接投与した。浸透ミニポンプ (Alzet モデル 1004) を使用し、アゴニスト (LPA、2S-OMPT、各 15 nM) を 2 週間にわたり 0.11  $\mu$ L/h の速度で持続的に投与した。
- 強制水泳試験 (FST) により抗うつ薬様効果を評価した。
- オープンフィールド試験 (OFT) により、自発行動量と不安様行動を評価した。
- 行動実験終了後のマウス海馬全を取り出し、抽出した RNA から RNA-seq を実施した。データ解析には、まず Trimmomatic (v0.39) を使用してトリミングし、次に STAR (v2.7.9a) を使用してアラインメントを行った。遺伝子発現の定量化には RSEM (v1.3.3) が使用され、TCC-GUI を使用して 2 群間比較の統計値を算出した。Rank-rank hypergeometric overlap (RRHO2, v1.0) や Ingenuity Pathway Analysis を使用し、遺伝子発現変化の解釈を行った。

### 4. 研究成果

代表的な TCA であるアミトリプチリンを用いて実験を行った。アミトリプチリンは LPA1 受容体の G タンパク質シグナル伝達を活性化するが、興味深いことに、 $\beta$ -arrestin シグナルはほとんど活性化しなかった。従って、アミトリプチリンが LPA1 受容体の G タンパク質バイアス型アゴニストであることが示された。このような G タンパク質バイアス型の活性は他の TCA にも見られるが、SSRI や SNRI などの比較的最近開発された抗うつ薬には見られなかった。

次に、LPA1 受容体の G タンパク質バイアス型アゴニストが抗うつ効果に重要であるか否かを検討した。市販の LPA1 受容体アゴニストのシグナル活性を評価したところ、2S-OMPT が非常に強

力な G タンパク質バイアス型アゴニストであることが明らかになった (G タンパク質の活性が  $\beta$ -arrestin のシグナル活性に比べて約 100 倍高い)。そこで、バランス型アゴニストである LPA と G タンパク質バイアス型アゴニストである 2S-OMPT の海馬内投与による行動変化を検討した。2S-OMPT を 2 週間投与すると、FST において抗うつ薬様効果を示し、OFT による不安様行動は観察されなかった。対照的に、LPA の投与では抗うつ効果はみられず不安様行動を引き起こした。これにより、G タンパク質バイアス型アゴニストが抗うつ効果に重要であることが示唆された。行動実験終了後に海馬を摘出し、RNA-seq を行った。2S-OMPT および LPA の長期投与が海馬において異なる遺伝子発現パターンを示すことが確認された。2S-OMPT は LPA1 受容体の下流シグナル (Rho および MAPK) を活性化する一方で、LPA はこれらを抑制することが示された。LPA1 受容体シグナルに関しては「うつ病様行動を促進する報告」と「抗うつ効果を示す報告」の相反する報告がなされており、その原因は不明であった。本研究で、同じ LPA1 受容体でも下流シグナルのバイアスにより相反する行動が誘導されることを世界で初めて証明し、過去の報告の矛盾を説明するシグナルメカニズムを提唱することができた。

以上より、TCA が SSRI よりも治療効果が高いとする臨床的知見から着想し、そのメカニズムを説明する分子として、LPA1 受容体を介したシグナルの可能性を明らかにした (図 1)。今後、モノアミンとは異なる薬理作用をもつ新たな抗うつ薬として、LPA1 受容体を標的とした治療薬の開発が期待される。

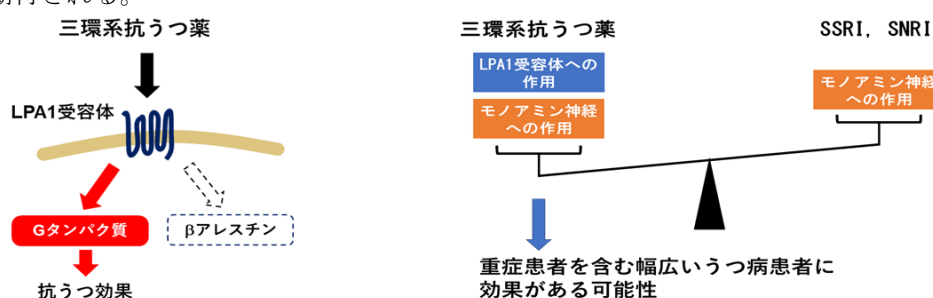


図 1 本研究結果から考える抗うつ薬の効果の違い

上記と並行して、既存薬から LPA1 受容体作動薬を探索するためのスクリーニングを実施した。スクリーニング途中で、LPA1 受容体のバイアスを評価することが重要であると判明したため、バイアスシグナルの評価も加えてスクリーニングを行った。既存薬 1630 化合物について、TGF $\alpha$  shedding assay を用いて、LPA1 受容体活性に関する 1 次スクリーニングを実施した。1 次スクリーニングでは N=1 で濃度は 20  $\mu$ M の 1 点に絞り実施した。その結果、上位 280 化合物をピックアップした。2 次スクリーニングでは、TGF $\alpha$  shedding assay と NanoBit  $\beta$ -arrestin recruitment assay を同時に実施し、LPA1 受容体の活性の再現性とシグナルのバイアスを考慮した。さらに、N=1 だが濃度を 1-10  $\mu$ M の 4 点に展開し、濃度依存的な変化も検討した。その結果、有望な化合物上位 63 化合物がピックアップできた。図 2 に示すように、2 次スクリーニングの結果では全体的に G タンパク質シグナルの方が強く  $\beta$ -arrestin が弱い傾向が得られた。これはアッセイ系の感度の問題である可能性があるため、3 次スクリーニングでは化合物の濃度を 100  $\mu$ M まで展開し N=3 以上の再現を行い、容量反応曲線から  $E_{max}$  と  $EC_{50}$  を算出し、シグナルのバイアス性を確認した。63 化合物全て評価するにはコストと時間がかかることから、より上位の化合物から順にアッセイを実施したところ、 $E_{max}$  で見たところ LPA1 受容体 G タンパク質シグナルが強く、 $\beta$ -arrestin シグナルは低い化合物が複数見つかった (図 3 左)。しかし、アッセイ系の感度の問題でシグナルの検出に差があるため、LPA をリファレンスとして LogRAI を計算 (計算方法は Kajitani et al. 2024 を参照) したところ、どの化合物も 2 つのシグナルに差がない結果となった (図 3 右)。

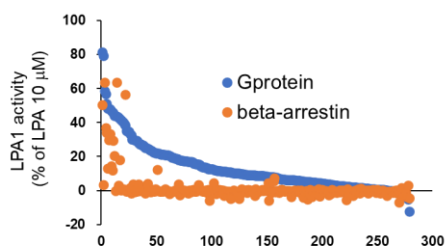


図 2 2次スクリーニング結果

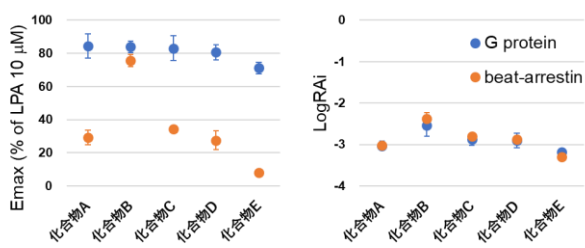


図 3 3次スクリーニング結果 (一部抜粋)

TGF $\alpha$  shedding assay は、LPA1 受容体の過剰発現系を用いた実験系である。上記スクリーニングで活性があるとされる化合物が、内因性の LPA1 受容体に作用し、機能的な役割を担うか評価するために、ナイーブな HEK293A 細胞に化合物を処置し、LPA1 受容体下流で遺伝子発現変化が誘導されることが分かっている遺伝子 C (未発表のため匿名化) の発現変化を調べた。その結果、遺伝子 C の発現が有意に増加し、その増加は LPA1 受容体の特異的な拮抗薬で完全に抑制された。

以上より、本研究を通じて既存薬の中に LPA1 受容体アゴニストが存在することが明らかとなった。これまで、LPA1 受容体アゴニストは、内因性リガンドである LPA の構造類似体しかなかったため、低分子化合物にも LPA1 受容体アゴニストが存在することが明らかとなったことは、今後 LPA1 受容体アゴニストを合成する際に非常に重要なデータとなる。残念ながら、今回実験した化合物の中では明らかなバイアス型アゴニストは見つからなかったが、今後、スクリーニングする化合物の数を増やし、G タンパク質バイアス型 LPA1 受容体アゴニストの探索を続けてゆきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okada-Tsuchioka Mami, Kajitani Naoto, Omori Wataru, Kurashige Takashi, Boku Shuken, Takebayashi Minoru	4. 巻 627
2. 論文標題 Tetraspanin heterogeneity of small extracellular vesicles in human biofluids and brain tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 146 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Omori Wataru, Kano Kuniyuki, Hattori Kotaro, Kajitani Naoto, Okada-Tsuchioka Mami, Boku Shuken, Kunugi Hiroshi, Aoki Junken, Takebayashi Minoru	4. 巻 24
2. 論文標題 Reduced Cerebrospinal Fluid Levels of Lysophosphatidic Acid Docosaehaenoic Acid in Patients With Major Depressive Disorder and Schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 948 ~ 955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ijnp/pyab044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Abe Hiromi, Okada Tsuchioka Mami, Kajitani Naoto, Omori Wataru, Itagaki Kei, Shibasaki Chiyo, Boku Shuken, Matsuhisa Tetsuaki, Takebayashi Minoru	4. 巻 43
2. 論文標題 Serum levels of high mobility group box 1 protein (HMGB1) and soluble receptors of advanced glycation end products (RAGE) in depressed patients treated with electroconvulsive therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 359 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/npr2.12358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koga Yusaku, Kajitani Naoto, Miyako Kotaro, Takizawa Hitoshi, Boku Shuken, Takebayashi Minoru	4. 巻 170
2. 論文標題 TCF7L2: A potential key regulator of antidepressant effects on hippocampal astrocytes in depression model mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Psychiatric Research	6. 最初と最後の頁 375 ~ 386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpsychires.2024.01.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kajitani Naoto, Okada-Tsuchioka Mami, Inoue Asuka, Miyano Kanako, Masuda Takeshi, Boku Shuken, Iwamoto Kazuya, Ohtsuki Sumio, Uezono Yasuhito, Aoki Junken, Takebayashi Minoru	4. 巻 49
2. 論文標題 G protein-biased LPAR1 agonism of prototypic antidepressants: Implication in the identification of novel therapeutic target for depression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 561 ~ 572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41386-023-01727-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyako Kotaro, Kajitani Naoto, Koga Yusaku, Takizawa Hitoshi, Boku Shuken, Takebayashi Minoru	4. 巻 170
2. 論文標題 Identification of the antidepressant effect of electroconvulsive stimulation-related genes in hippocampal astrocyte	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Psychiatric Research	6. 最初と最後の頁 318 ~ 327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpsychires.2024.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 梶谷直人, 岡田麻美, 朴秀賢, 竹林実.
2. 発表標題 うつ病の病態メカニズムにおけるリゾホスファチジン酸受容体の役割.
3. 学会等名 第44回日本生物学的精神医学会・第32回日本臨床精神神経薬理学会・第52回日本神経精神薬理学会年会・第6回日本精神薬学会総会・学術集会 4学会合同年会(BPCNPPPP4学会合同年会) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koga Y, Miyako K, Kajitani N, Boku S, Takebayashi M.
2. 発表標題 Comprehensive analysis of gene expression hippocampal astrocytes in a model of depression.
3. 学会等名 Neuroscience 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyako K, Koga Y, Kajitani N, Boku S, Takebayashi M.
2. 発表標題 Establishment of a clinical setting-associated behavioral model of ECT and investigation of the mechanism of action of ECT with focus on astrocytes.
3. 学会等名 Neuroscience 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Boku S, Toda H, Koga M. Kajitani N, Takebayashi M.
2. 発表標題 Neonatal maternal separation-induced alternation of miRNAs and their possibility as biomarkers of major depressive disorder.
3. 学会等名 Neuroscience 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梶谷直人、岡田麻美、朴秀賢、竹林実
2. 発表標題 アストロサイトを介した三環系抗うつ薬の新たな作用機序
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会・第51回日本神経精神薬理学会合同年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶谷直人、岡田麻美、井上飛鳥、朴秀賢、青木淳賢、竹林実
2. 発表標題 三環系抗うつ薬はGタンパク質バイアス型LPA1受容体作動薬として抗うつ効果に関与する
3. 学会等名 第45回日本生物学的精神医学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梶谷直人、岡田麻美、朴秀賢、竹林実
2. 発表標題 三環系抗うつ薬の抗うつ効果にはGタンパク質バイアス型LPA1受容体活性が重要である
3. 学会等名 第42回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoto Kajitani, Mami Okada-Tsuchioka, Shuken Boku, Minoru Takebayashi
2. 発表標題 Lysophosphatidic acid receptor 1 in astrocytes as a therapeutic target for depression
3. 学会等名 Naito Conference 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>熊本大学大学院生命科学研究部 神経精神医学講座  <a href="https://www.kumamoto-neuropsych.jp/">https://www.kumamoto-neuropsych.jp/</a>          熊本大学大学院生命科学研究部附属 健康長寿代謝制御研究センター  <a href="http://www.medphas.kumamoto-u.ac.jp/cmha/">http://www.medphas.kumamoto-u.ac.jp/cmha/</a></p>
---

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	可野 邦行  (Kano Kuniyuki)  (50636404)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------