

## 分子薬理学的アプローチによる新規創薬標的分子の機能解析

馬場 明道

**Molecular Pharmacologic Approaches to Functional Analysis of  
New Biological Target Molecules for Drug Discovery**

Akemichi BABA

*Molecular Pharmacological Laboratory, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Osaka University, 1-6 Yamada-oka, Suita City 565-0871, Japan*

(Received June 4, 2007)

This review focuses on two pharmacologic approaches to the functional evaluation of new target molecules for drug discovery. One is the development of a novel specific antagonist of the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX) SEA0400. The other is a comprehensive analysis of the functions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuropeptide ligand for G protein-coupled receptors. NCX is the one of the last target molecules regulating the cellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. There was no efficient way to address the pathophysiologic roles of NCX until a specific antagonist, 2-[4-[(2,5-difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline (SEA0400), was developed. Our recent studies using SEA0400 clearly showed the possible roles of NCX in several pathologic states of cardiovascular and nervous tissues. In our second approach including gene-targeting methods, we found new, unexpected roles of PACAP in higher brain functions, such as psychomotor, cognition, photoentrainment, and nociception. Based on these experimental findings, a genetic association study in schizophrenia patients revealed that the single-nucleotide polymorphisms of the PACAP gene are significantly associated with the hypofunction of the hippocampus. Regarding the peripheral roles of PACAP, we found that PACAP is involved not only in the regulation of insulin secretion in pancreatic islets, but also in the regulation of islet turnover. In subsequent phenotypic analysis of PACAP transgenic mice, we identified novel candidate genes that probably have promising functional roles.

**Key words**—pharmacologic evaluation; target molecule; gene targeting;  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger; pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; schizophrenia

## はじめに

1991年に教授就任するとともに、「新規シグナル系の機能的分子基盤を明らかにすることは、生理・病態解明に留まらず、特異的な新しい創薬標的候補分子を提示することにもつながる」という考えを研究の基本コンセプトに掲げた。そして、新規シグナル系としての神経ペプチド、pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) と創薬標的細胞としてのグリア細胞の機能分子という2つの未開拓の課題を研究対象に選択し、研究手法として分子生物学的手法を取り入れた分子薬理学的アプ

チにより実施してきた。新規標的分子の機能解析の手法には、1) 特異的リガンドの開発とその薬理効果の評価というコンベンショナルアプローチ、2) 遺伝子改変手法による先端的アプローチ、の2つがある。1) については、まさに、これまでの薬理学が蓄積してきた手法で、アゴニスト、アンタゴニストなどの適用による、急性・亜急性の機能変化を解析する方向である。教科書的に知られている薬剤はほとんどがこの手法により開発されてきている。一方、例えば、ペプチドをリガンドとする受容体など、低分子リガンドの開発が困難である場合、その機能評価はその遺伝子発現を人為的に制御した遺伝子改変マウスを作成し、その機能変化(表現型)を解析することでその分子の役割を探る。近年、組織選択性、生後の時期選択性を持たせた遺伝子改変マウスの作成も行われるようになってきたが、多くの

大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野(〒565-0871  
吹田市山田丘1-6)

e-mail: baba@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成19年度日本薬学会賞の受賞を記念して  
記述したものである。

場合、この手法での機能解析は発生後の長期に渡る機能変異であることに留意すべきである。したがって、理想的には新規標的分子の最終的機能評価は、1) と 2) の両方を合わせて初めて全体が見渡せると言える。われわれは、以下に示す課題において、これらの2つの手法を駆使し、新規標的分子の機能的側面を明らかにしてきた。

われわれの研究テーマのうち、グリア細胞の標的分子の探索については、現在、グリア細胞は、世界的にも主要な脳神経研究のターゲットとして広範な研究が進み、脳機能調節におけるその重要性が焦点となってきた。研究室を立ち上げた1991年当時は、グリア細胞の1つであるアストロサイトの培養法が確立されつつある時代であり、グリアはニューロンの補助的な役割に過ぎないというそれまでのセントラルドグマに、小さな穴が開き始めた頃であった。ましてや、グリア細胞に新たな薬物標的分子を見い出していく考えは、極めて珍しいものであったと言える。われわれは、アストロサイトの新規標的分子として、主に、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換系 (NCX) とエンドセリン B 受容体を選択し、その薬理的機能研究により、前者については世界で初めての特異的阻害剤を開発し、NCX 機能研究の端緒を開いた。後者については、脳傷害病態におけるエンドセリンシグナル系の関与を明らかにすることができた。

一方、神経ペプチド PACAP は1989年に Miyata らにより見出されたペプチドで、内分泌系の機能が予測されていたものの、われわれが研究をスタートした1992年頃まで、ほとんど研究がなされておらず、機能未知のシグナル分子であった。われわれは、本課題の遂行においては、リガンド、受容体のゲノム解析から、細胞生理、遺伝子改変マウスの作成とその表現型解析に至る包括的機能解析を導入し、PACAP シグナル系が高次脳機能を筆頭に、いくつかの重要な生理作用、病態発現に係わる因子であることを明らかにした。また、その過程で、PACAP 遺伝子の変異がヒト統合失調症の海馬機能低下の脆弱因子であることも明らかにすることができた。

以下、これらの研究のうち、NCX 阻害剤の開発と PACAP の包括的機能解析の概要についてのみ紹介する。

## 1. グリア細胞 NCX

NCX は、細胞膜を隔てた  $\text{Na}^+$  の濃度勾配及び膜

電位に依存して  $\text{Ca}^{2+}$  を輸送するトランスポーターである。正常時は  $\text{Ca}^{2+}$  を汲み出す順モードで作動するが、細胞内  $\text{Na}^+$  が増加すると細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  を流入する逆モードで作動する。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  はシグナル分子として種々の細胞機能に係わっており、その細胞内濃度は細胞膜や細胞内小器官に存在する種々の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル、 $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ、NCX により調節されている (Fig. 1).<sup>2)</sup> 電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルをはじめ、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度調節蛋白は重要な創薬標的分子であり、そのリガンドが薬剤として確立されているものが多い。その観点から NCX は最後に残された有望な分子として期待されている。NCX の機能に関するわれわれの知見の詳細は、総説<sup>2-4)</sup>を参照されたい。

**1-1. NCX とアストロサイトのアポトーシス組織あるいは細胞を低  $\text{Ca}^{2+}$  溶液に短時間曝露後  $\text{Ca}^{2+}$  を含む溶液でインキュベートすると細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加とそれに引き続く細胞機能の低下が起こることが知られている。この現象は一般に  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックス障害と呼ばれており、*in vitro* 虚血-再灌流モデルとして研究に用いられる。われわれは、アストロサイトで  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックス負荷により遅発性細胞死が発現することを見出し、<sup>5,6)</sup> アンチセンスを用いた実験より、NCX の逆モードを**

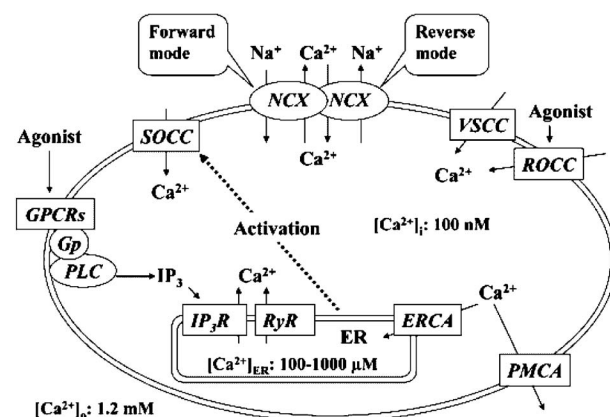


Fig. 1. Regulation of Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$

Many transporters, receptors and enzymes are involved in the regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX) mediates not only  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion across the plasma membranes (forward mode) but also  $\text{Ca}^{2+}$  influx upon reduction of the  $\text{Na}^+$  electrochemical gradient (reverse mode). VSCC: voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channel, ROCC: receptor-coupled  $\text{Ca}^{2+}$  channel, GPCRs: G protein-coupled receptor, SOCC: store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel, PLC: phospholipids C, Gp: G protein,  $\text{IP}_3\text{R}$ ,  $\text{IP}_3$  receptor, RyR: ryanodine receptor, ER: endoplasmic reticulum, ERCA: ER  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, PMCA: plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. The figure was reproduced by the courtesy of *J. Pharmacol. Sci.*<sup>4)</sup>

介する  $\text{Ca}^{2+}$  過流入が本障害のトリガーになっていること、さらに、そのアポトーシスの細胞内シグナルカスケードを明らかにした (Fig. 2).<sup>2-10)</sup> 虚血障害発現における活性酸素の重要性は種々の実験モデルで提唱されているが、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスにおいても、活性酸素の産生が増加することを認めた。実際、アストロサイトを過酸化水素に短時間曝露後正常溶液でインキュベートすると、 $\text{Ca}^{2+}$  パラドックス負荷の場合と同様の遅発性細胞死がみられる。 $\text{Ca}^{2+}$  パラドックス負荷による活性酸素の産生並びに細胞障害は、NCX 阻害薬、細胞内、カルパイン阻害薬、キサンチンオキシダーゼ阻害薬、グルタチオン、カタラーゼにより抑制される。すなわち、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加により  $\text{Ca}^{2+}$  依存性プロテアーゼであるカルパインが活性化とそれに引き続くキサンチンオキシダーゼの活性化が引き起こされ、活性酸素の産生増加と遅発性細胞死が起こると推測される。筆者らは、 $\text{Ca}^{2+}$  パラドックス負荷あるいは過酸化水素曝露がアストロサイトの NF- $\kappa$ B の活性化を引き起こすことを認めた。<sup>8)</sup> また、過酸化水素曝露による NF- $\kappa$ B の活性化並びに遅発性細胞死は、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性タンパク脱リン酸化酵素カルシニューリンの阻害薬 FK506 及び熱ショックタンパク質 (HSP) によって抑制されることより、NF- $\kappa$ B 活性化制御におけるこれらの因子の薬理学的重要性が考えられる。<sup>7)</sup>

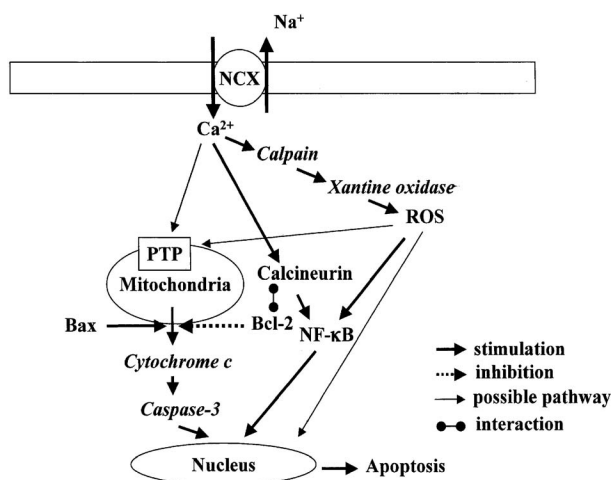


Fig. 2.  $\text{Ca}^{2+}$  paradox-induced Apoptosis of Astrocytes  
After incubating astrocytes in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium, a change of the medium to  $\text{Ca}^{2+}$ -supplemented one is followed by an astrocytic cell death ( $\text{Ca}^{2+}$  paradox).  $\text{Ca}^{2+}$  paradox is characterized by a massive  $\text{Ca}^{2+}$  influx through NCX. The figure depicts cellular signal cascades leading to astrocytic apoptosis induced by  $\text{Ca}^{2+}$  paradox.

$\text{Ca}^{2+}$  パラドックス負荷後のアストロサイトはアポトーシスでみられる形態学的、生化学的变化を示す。すなわち、本ストレス負荷後では、ヘキスト染色によるクロマチンの凝縮並びにアガロース電気泳動で DNA 断片化が認められる。<sup>8)</sup> これらの成績は、 $\text{Ca}^{2+}$  パラドックス負荷によるアストロサイトの遅発性細胞死にアポトーシスが関与することを示す。

Figure 2 は、われわれの成績よりまとめたアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックス障害におけるアポトーシス発現のシグナルカスケードを示す。<sup>4)</sup>

**1-2. NCX の特異的阻害剤の開発** アストロサイトに機能的に NCX 分子が存在することを確認したことから、1995 年、大正製薬研究所と共同で、NCX の特異的阻害剤開発プロジェクトをスタートさせた。アストロサイトと心筋 membrane vesicle を用いたスクリーニング系により、ランダムスクリーニング、誘導体合成展開、さらに、HTS スクリーニングを実施し、2001 年に新しい NCX 阻害薬、2-[4-[(2,5-difluorophenyl) methoxy] phenoxy]-5-ethoxyaniline (SEA0400) (Fig. 3) を開発した。<sup>11)</sup> SEA0400 は、神経細胞、グリア細胞、心筋細胞の NCX 活性を 10–100 nM の濃度で強く抑制するが、種々のイオン輸送系、イオンチャンネル、トランスポーター、受容体、酵素に対しては 10  $\mu$ M の濃度においても全く影響を及ぼさない。<sup>11)</sup> 選択性に関しては、NCX 阻害薬として従来使われていた KB-R7943 がアセチルコリン受容体、NMDA 受容体、容量性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル、ノルアドレナリントランスポーターに作用するのに対して、SEA0400 はこれらの分子に影響しない。

NCX には NCX1, NCX2, NCX3 と 3 つのアイソフォームがあり、NCX1 は多くの組織に広く存在し、NCX2, NCX3 は脳、骨格筋に局在している。脳には 3 つのアイソフォームが存在し、胎仔あるいは生後未熟な時期では NCX1 がメインであるが、

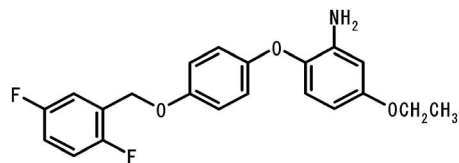


Fig. 3. SEA0400, 2-[4-[(2,5-Difluorophenyl) methoxy] phenoxy]-5-ethoxyaniline, is a Newly Developed Specific Inhibitor of NCX

生後発育に伴い選択的に NCX2 が著明な増加を示すため成熟脳では NCX2 がメインとなる。<sup>12)</sup> SEA0400 の NCX アイソフォームに対する作用は NCX1 > NCX2 >> NCX3 の順に強い。<sup>13)</sup> NCX の機能研究は、そのノックアウトマウスが胎生致死であることから、その有効なツールがなかったこともあり、ほとんど進んでいなかった。SEA0400 は、その特異性、*in vivo*, *in vitro* での有効性から、NCX 機能研究には極めて有用なツールとなった。われわれは本化合物を国内外に供出しているが、本分子の示す生理病態的役割の研究が飛躍的に進んでいる。Table 1 に SEA0400 の国際共同研究での成果の一部を示す。これらに示されるように、SEA0400 は基礎的には、細胞内 Ca<sup>+</sup> 濃度調節機構の研究に、ブレークスルーをもたらし、臨床的には虚血性障害への有効性、食塩感受性高血圧に著効を示す知見が得られている。今後、NCX のアイソフォーム特異的阻害剤の開発などが進むことにより、本分子を標的とする薬剤が開発されると予想される。

Table 1. Possible Roles of NCX in Various Pathophysiological States

Excitotoxicity of retinal ganglion cells <sup>14)</sup>
Neuronal and glial cell death <sup>15,16)</sup>
Cardiac ischemia <sup>17)</sup>
Inhibition of cardiac NCX1.1 accompanied by cardiac protection <sup>18-20)</sup>
Renal re-perfusion injury <sup>13)</sup>
Ca <sup>+</sup> oscillation in Cajal cell of smooth muscle <sup>21)</sup>
Cardiac Ca <sup>+</sup> current <sup>22)</sup>

## 2. 神経ペプチド PACAP

**2-1. ゲノム解析から細胞生理作用** PACAP は、1989 年、ヒツジ脳視床下部から単離・同定されたニューロペプチドで、38 アミノ酸からなる PACAP38 と、その N 末 27 アミノ酸からなる PACAP27 の 2 つのフォームが存在する。<sup>1)</sup> Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) とアミノ酸配列の相同性が高く、VIP/セクレチン/グルカゴンファミリーに属している。PACAP には現在 3 つの受容体 PAC1, VPAC1, VPAC2 が知られている。PAC1 は PACAP に選択的な受容体であり、VIPAC1, VPAC2 は、VIP に対しても親和性を示す。一方、いわゆる VIP 受容体として知られている VPAC1 受容体と VPAC2 受容体は PACAP にも同様の高い親和性を示す。したがって、PACAP の作用はこれら 3 種の受容体を介して発現する。これら受容体は膜 7 回貫通型の GPCR で、cAMP, MAP キナーゼの細胞内シグナルを動員する。PACAP の一般的な知見については、Vaudry らの優れた総説<sup>23)</sup>を参照されたい。

PACAP の役割を解明することを目的に、われわれは次のような包括的機能解析を進めてきた。

まず、Northern 及び *in situ* hybridization により、受容体及びリガンド mRNA 局在を解析し、PAC1 受容体の脳への特異的分布を明らかにした。<sup>24)</sup> (Fig. 4) 脳では PAC1 受容体及び VPAC1 受容体は広範な神経核にそれぞれ固有のパターンで発現すること、末梢では特に交感神経節及び副腎髄質に PAC1 受容体と PACAP が共発現することを

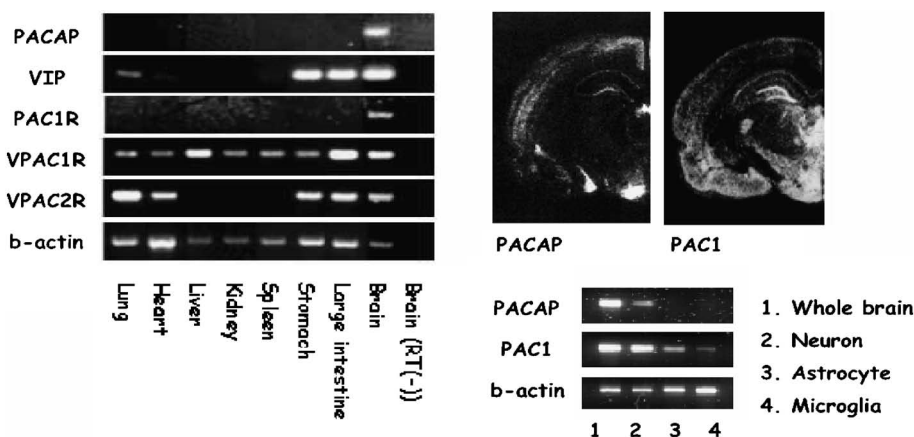


Fig. 4. Distribution of mRNAs of PACAP, VIP and Their Receptors in Various Tissues. *In situ* hybridization of PACAP and PAC1 receptor in brain reveals their specified regional localizations.

明らかにした。<sup>24,25)</sup> 脳内で PACAP 神経は極めて幅広く投射しており、視床下部や橋の神経核、扁桃体に高密度に投射するほか、嗅球、大脳皮質、海馬、脊髄、小脳などにも投射し、様々な脳機能に関与すると考えられる。<sup>24)</sup> PAC1 受容体は脳内に幅広く発現し、VPAC1 受容体は海馬と大脳皮質に、VPAC2 受容体は視床、視交叉上核、扁桃体、海馬に強く発現する。このような受容体の幅広い発現分布は、摂食や睡眠（視床下部）、などの生理機能のみならず、情動（扁桃体）、認知機能（大脳皮質）、日内リズム（視交叉上核、松果体）、記憶・学習（海馬、扁桃体）などの高次脳機能においても PACAP がなんらかの役割を果たす可能性を示唆するものと言える。

次に、遺伝子改変マウスの作成をめざし、マウス PAC1 受容体、<sup>26)</sup> VPAC1 受容体、<sup>27)</sup> PACAP<sup>28)</sup> のゲノム DNA を単離し、構造を決定した。また、受容体の構造-機能研究を目的とし、PAC1 と VPAC1 及びセクレチン受容体間のキメラ体を多種作製することで受容体のドメイン構造を明らかにした。<sup>29)</sup> PACAP の細胞レベルでの作用の検討については、得られたゲノム DNA を用いて、PACAP 遺伝子のプロモーター活性の調節等を *in vitro* 培養細胞で解析するとともに、それに係わる細胞内情報伝達系を明らかにした。<sup>30-34)</sup> PACAP 遺伝子発現制御に関して、特記すべきことは、PACAP 自身がその遺伝子発現を促進すること、また、NGF がその作用において PACAP と相乗的に働くことである。その細胞内クロストーク (Fig. 5) に示すように、PACAP と NGF の相乗作用は、PACAP 遺伝子発現以外に、PC12 細胞の神経突起伸展においても顕著に認められる。PACAP 遺伝子発現には、MAP キナーゼ ERK 及び p38 が関与すること、さらに PACAP による神経突起伸長は、ERK 依存的、p38 非依存的であることなど、その細胞内シグナル機構を明らかにした。PACAP のシグナル系は cAMP 系、Ca<sup>2+</sup> 系が主要なものであることが知られているが、これらの結果は新たに PACAP シグナル系に MAP キナーゼ系が複雑に絡み、種々の細胞機能調節に係わることを初めて示したものである。PACAP のその他の細胞生理作用として、種々の細胞での誘発性障害に対して防御的に働くことが知られている。<sup>24)</sup> われわれの検討でも、大脳皮質由来初

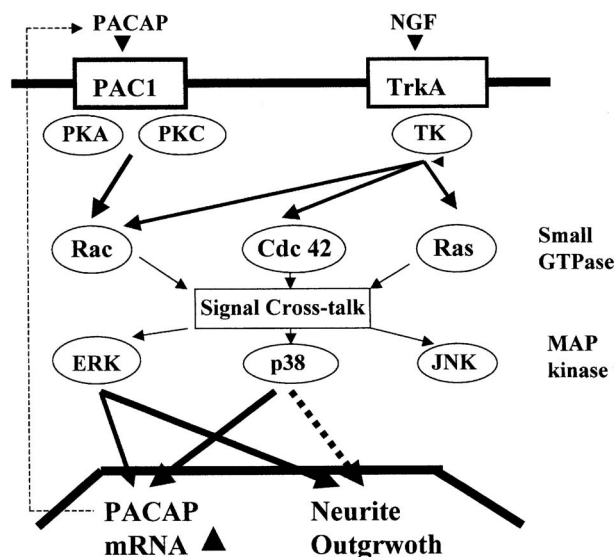


Fig. 5. Signal Cross-talks between PACAP and NGF in PC12 Cells

PACAP and NGF independently enhance the expression of PACAP mRNA and neurite outgrowth. These two signals in combination produce the synergistic effects. The cross-talk in cellular MAP kinase system is responsible for the synergistic effect. TrkA: NGF receptor, PKA: protein kinase A, PKC: protein kinase C, TK: tyrosine kinase.

代培養神経細胞のグルタミン酸傷害に対して、内因性の PACAP がその傷害程度を軽減し、その機序としてグルタミン酸が急激な PACAP 遺伝子発現を増加すること、内因性 PACAP は BDNF 発現を増加させること<sup>35)</sup>を報告している。

**2-1-1. 脳の発生・成熟と PACAP** 脳における PACAP, PAC1 受容体の発現は成体よりもむしろ胎生期や生後初期に顕著にみられる。また、PAC1 受容体は生後も神経新生が起こると考えられている成体の嗅球や海馬歯状回に強く発現していることから、PACAP は成体脳における神経伝達物質・神経調節因子としての機能のほかに、発生・発達期あるいは成体における神経新生の調節因子として機能している可能性がある。したがって、PACAP は成体脳における神経伝達物質・神経調節因子としての機能のほかに、発生・発達期あるいは成体における神経新生の調節因子として機能していることも考えられる。<sup>23,36)</sup>

**2-2. 生理と病態** 新しいシグナル系の生理・病態機能への係わりは、そのシグナル（入力系）強度を人為的に変化させたときの機能変化（出力系）の解析から求めることができる。入力系を変化させる手段として、アゴニスト、アンタゴニストなどの

リガンドを用いた急性・亜急性のもの、そのシグナル系の遺伝子改変による長期のもの2つがある。急性・亜急性のものとしては、PACAP脳室内直接投与によるオキシトシンなどの神経内分泌調節作用や、摂食、飲水、体温などへの作用、さらには、日内リズムの位相調節、運動行動調節、記憶学習などのより高次な脳機能への作用も報告されている。<sup>23)</sup> これらの知見はPACAPが神経伝達物質・調節因子として種々の脳機能に係わる可能性を示すものの、薬理作用なのか生理作用なのかについては断定できない。最近になり、われわれを始めとして、遺伝子改変手法を用いたPACAP機能解析が進んできた。<sup>37-41)</sup> 以下、われわれの知見を中心に、PACAP遺伝子ノックアウトマウス(PACAP-KO)の表現型とその生理・病態的意義について概説する。

## 2-2-1. 中枢神経系

**2-2-1-1. 精神行動異常** PACAP-KOは、Table 2に示すように、多くの際だった中枢表現型を示す。精神行動異常については、1) 多動(新規環境への順応が低下)、2) 異常ジャンプ行動、3) プレパルスインヒビション(PPI)の低下、4) 海馬性長期増強(LTP)、認知機能(記憶の維持過程)の障害を特徴とする。<sup>42)</sup> 本マウスの示す多動は、環境への順応力の低下を意味するものであり、野生型では自発運動が収束した時点においても活発な活動を維持する。また、短時間に爆発的なジャンプ行動を示す。一方、PPIは齧歯類からヒトまで保持されている前頭皮質の感覚情報処理能を示すパラメーターで、ヒトの統合失調症などの精神疾患、NMDA受容体ノックダウンマウスやフェンシクリジン投与マウスなどの統合失調症モデルなどで低下し、それが抗統合失調症薬で改善することから、これら疾患の重要な指標と位置付けられている。

Table 2. Brain Phenotypes of PACAP-KO Mice and Their Relevances to Human Pathophysiology

Phenotype	Related pathophysiology
Psychomotor dysfunction <sup>37,43)</sup>	Schizophrenia <sup>48)</sup> , ADHD <sup>43)</sup>
Cognitive defects <sup>44)</sup>	Schizophrenia, Cognitive defects
Disrupted biological clock <sup>45)</sup>	Phototentrainment (affective disorder)
Loss of neuropathic pain <sup>46)</sup>	Nociception
Vulnerability to ischemia <sup>47)</sup>	Brain ischemic damages

遺伝子改変動物の表現型の評価は、外部入力(環境、薬物など)に対する二次反応性を加えることで明確になることがある。そこで、精神作用薬の薬理効果を検討したが、上記3つの異常は、非定型統合失調症薬(5-HT/ドパミン受容体拮抗薬)、リスペリドンですべて改善され、定型統合失調症薬(ドパミン受容体拮抗薬)、ハロペリドールは多動、異常ジャンプを抑制するが、PPI低下は抑制しなかった。<sup>42,43)</sup> すなわち、これら表現型とそれに対する薬物反応性の類似性からは、PACAP-KOが統合失調症の機能障害を一部、表現しているモデルであると言える。一方、PACAP-KOの記憶学習機能については、海馬CA1、歯状回ニューロンLTPの低下とともに、モリス水迷路、恐怖条件付け、新規物体探索などの記憶学習テストにおいて、海馬依存性の記憶維持障害が認められる。さらに、強制水泳試験における無動時間が、PACAP-KOで延長し、それをリスペリドンが抑制することも見出ししている(未発表)。強制水性試験の無動時間を鬱状態の反映と想定すると、本マウスは統合失調症の陽性、陰性症状に類似した表現型を示すモデルと言える。NMDAシナプス伝達の低下に基づくグルタミン酸神経機能低下とドパミン神経機能過剰が、これら以上の神経機構と考えることができる。一方、PACAP-KOの記憶障害を始めとする中枢表現型の多くのもが、PACAPの脳室内投与によりレスキューされることを明らかにしている。この結果は、これら表現型の発現機序が、脳の発生・発達における基質的異常によるものではなく、成熟時での神経伝達の異常など、PACAP欠損による即時的なものに依ることを示している。

(a) 統合失調症患者におけるPACAP遺伝子変異(SNP) 国立精神神経センター橋本(現阪大医)らとの共同研究で、ヒト統合失調症でのgenetic association studyを実施した。PACAP遺伝子には7つの一塩基多型(SNP)が存在し、そのうちの2つ(SNP3, SNP5)について、正常者、統合失調症患者を対象とした関連解析から、同疾患の中間表現型としての海馬認知機能の低下、海馬容積の減少に関して、患者においては、メジャーアレルとマイナーアレルの間に統計的有意差が認められた。<sup>48)</sup> 統合失調症のリスク遺伝子の解析研究は、現在、世界中で精力的に始まっている。現在まで、10種類

以上の脆弱因子が同定されている。その中で、統合失調症を発症するスコットランドの家系の解析から見い出された DISC1 (Disrupted in schizophrenia 1) は、染色体 1 番と 11 番の間の転座により、変異型遺伝子 (C 末端の 257 アミノ酸を欠失) となっているものであり、有力な本疾患の脆弱遺伝子として高い注目を集めている。<sup>49)</sup> 正常 DISC1 は、数種類の結合タンパクと複合体を形成し、神経突起伸展、神経細胞遊走に係わる因子であることなど、その細胞生理作用の解明が進みつつある。DISC1 とその結合タンパクの 1 つの DBZ との結合を PACAP が制御することを、ごく最近、遠山らとの共同研究で明らかにした。<sup>50)</sup> 先述のように、PACAP は PC12 細胞の神経突起伸展を促進する。したがって、PACAP の神経細胞での細胞生理作用に、DISC1 シグナル系との機能的関与が十分考えられる。

統合失調症は脳の複合的な機能異常を示す疾患で、それぞれの病態発現には、ドパミン、グルタミン酸、セロトニン神経系を始めとする複数の神経回路の機能異常が関与すると考えられている。近年の非定型抗精神病薬の作用点の多様性もそれを裏付ける。PACAP のグルタミン酸神経伝達への関与については、PACAP が PAC1 受容体を介する cAMP 産生-PKA シグナル系を介して、NMDA 受容体複合体の活性化を制御することが報告されている。<sup>51)</sup> 併せて、PACAP 神経系がグルタミン酸神経伝達を制御することは、LTP や記憶・学習、概日リズム調節、<sup>45)</sup> 神経因性疼痛<sup>46)</sup> などの現象でも認められる。したがって、PACAP の中枢機能の多様性は、グルタミン酸神経の NMDA シナプス伝達への関与から生み出されるものと考えられる。

(b) 注意欠陥・多動性障害 (Attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) ADHD は就学年齢児童にかなりの頻度でみられる精神行動障害で、注意欠陥 (dysfunction of sustained attention)、行動上の多動、衝動性を特徴とする。臨床的には 1) 注意力散漫と多動が共存、2) 注意力散漫が主たるもの、3) 多動性が主たるものの 3 つのタイプがある。原因、発症機序は明確ではないが、前頭葉の機能異常が原因と考えられている。精神興奮薬が臨床的に有効であることは共通で、その作用はアミンの遊離促進、特にドパミンの遊離を促進する。したがって、前頭葉のドパミン神経の機能異常がその要因

の 1 つであることが考えられる。動物モデルは、ADHD に認められる行動異常を持っていること (face validity)、発症仮説、有効治療の理論と一致していること (construct validity)、未知の新しい予測、治療法の提示 (predictive validity) を示すものでなければならない。ADHD の動物モデルとして、自然発症高血圧ラット (SHR)、ドパミントランスporterノックアウト (DAT-KO) マウス、colomoba マウス、新生時でのドパミン神経の傷害モデルなどいくつかあるが、いずれも臨床的な ADHD をすべてカバーするものではない。

この疾患における精神運動興奮薬の逆説的鎮静作用は薬理的にも極めて興味深い。DAT-KO マウス<sup>52)</sup>の多動が、同様に精神運動興奮薬により抑制される。PACAP-KO の示す多動は新規環境において顕著にみられるもので、先述のようにドパミン神経遮断作用を持つ抗統合失調症薬で抑制される。加えて、その初期の多動に対して、精神運動興奮薬アンフェタミン、メチルフェニデートは抑制し、むしろ逆に鎮静作用を示すこと (逆説的鎮静作用) が認められた。<sup>43)</sup> このとき、前頭皮質のアンフェタミンによる c-Fos 反応性ニューロンが PACAP-KO で増加していた。さらに、このアンフェタミンの逆説的鎮静作用は、5-HT1A 受容体拮抗薬 WAY100635 の同時投与により拮抗された。また、野生型マウスでアンフェタミンの興奮作用はその初期において 5-HT1A アゴニスト、8-OH-DPAT により逆転する。<sup>43)</sup> これらの知見は、PACAP-KO が ADHD に対する精神運動興奮薬の治療機構解明の有用なモデルとなること、アンフェタミンは基本的に興奮、鎮静の両面の作用を持つことを示す。

ADHD の薬物治療はメチルフェニデートに代わるものとしてノルアドレナリン選択的取り込み阻害剤のアトモキセチンが近年、上市されたが、有効で安全性の高い薬剤の開発は喫緊の課題となっている。上記のわれわれの知見は、発展的には、5-HT1A アゴニストが同疾患の薬物治療候補 (主剤あるいは、補助薬剤) となる可能性を提示するものである。

**2-2-1-2. 神経因性疼痛制御機構** 神経因性疼痛は、薬物治療の有効性がいまだ、完全には確立されていない痛みで、その発現は、脊髄を中心とする痛覚伝導路の神経可塑性に起因する。これまでの研

究から、神経因性疼痛の発症について、神経細胞、ミクログリアなどの各種の生理活性因子の関与が明らかになっている。PACAP-KO で検討すると、神経因性疼痛、アロディニア、慢性炎症性疼痛反応が消失していた。<sup>46)</sup> 脊髄神経切断による同側性下肢の疼痛閾値の低下の分子機構として、脊髄神経切除により、脊髄での PACAP 発現上昇に伴い NO 合成酵素 (NOS) の活性化、NO 産生増加が起きること、PACAP は NMDA による nNOS の細胞膜への移行を促進することで、NO 産生を高めることを明らかにした。<sup>46)</sup>

**2-2-1-3. 生物時計調節** 網膜からの視交叉上核 (SCN) へのグルタミン酸神経入力による概日リズムの調節を PACAP が制御することが知られている。<sup>23)</sup> PACAP-KO では、明暗周期に変化はみられないが、光による位相前進 (恒暗条件下での光刺激による行動位相の前進) が選択的に抑制されることを見出した。<sup>45)</sup> Per1 などの時計遺伝子が、光による行動位相の制御に関与することが知られているが、位相前進に選択的に関与する分子は見い出されていない。そこで、光による位相前進に係わるシグナル分子を探索するために、PACAP-KO の SCN の網羅的遺伝子発現解析から、PACAP 存在下に光による位相前進に伴い発現する遺伝子として、プロスタグランジン D 合成酵素を見出した。さらに、種々の薬理的検討から、プロスタグランジン D2 がその因子であることを見い出している (投稿中)。

**2-2-1-4. 虚血脳障害** PACAP は種々の細胞において、実験的細胞障害に対して MAP キナーゼ系を介して、防御的に働くことが知られており、当初は神経系での機能として、神経細胞死保護作用が最も注目されていた。そこで、われわれは、塩田らとの共同研究により PACAP-KO での脳虚血を検討した。<sup>47)</sup> その結果、KO マウスでは、中大脳動脈閉塞モデルでの脳障害が増悪すること、脳梗塞による細胞死、機能障害は PACAP の脳室内投与で抑えられることを見出した。この知見は、PACAP は内因性の神経保護因子であることを示すもので、その分子機序として、PACAP が IL6 シグナル系にリンクすることも明らかにした。

**2-2-1-5. 遺伝的 PACAP 血症** ベルギーで見い出された遺伝的高 PACAP 血症を示す 18 番染色

体短腕の部分トリソミー患者の血小板機能低下が PACAP の過剰発現に依ることと、PACAP-KO マウスの血小板では凝集能が変化することなどから、PACAP が血小板機能に係わる因子であることを国際共同研究で実証した。<sup>53)</sup> PACAP の遺伝的ヒト疾患の初めての報告で、本患者は血小板機能低下を示すとともに、重度の精神遅滞を示す。

**2-3. 膵臓機能** 膵臓においては、PACAP 免疫陽性神経が膵島に投射し、PACAP 受容体のサブタイプのうち PAC<sub>1</sub> と VPAC<sub>2</sub> が発現している。また単離膵島での検討では、PACAP はグルコースにより惹起されるインスリン分泌を  $10^{-13}$  から  $10^{-14}$  という極めて低濃度で著明に促進する。<sup>54)</sup> これらの知見から、PACAP はホルモンの刺激分泌連関に係わる因子として当初から注目されていた。<sup>55)</sup> PACAP が種々の細胞での細胞保護作用、分化あるいは増殖促進作用を持つことから、インスリン分泌調節以外にも膵臓機能に係わるものが予測される。そこで、われわれは、PACAP-KO に加え、膵臓特異的 PACAP トランスジェニックマウス (PACAP-Tg)、<sup>56)</sup> PACAP-Tg と II 型糖尿病マウス (KKAy) との交雑マウス (Tg×Ay)<sup>57)</sup> を作成し、その表現型解析から糖尿病病態への PACAP の係わりを検討した。その結果を要約すると、1) 膵臓の内因性 PACAP を増加させると (Tg)、インスリン分泌が亢進し、ストレプトゾトシン誘発糖尿病 (I 型糖尿病のモデルで、膵臓が傷害される) にみられる膵臓障害が軽減する。同時に、 $\beta$  細胞の増殖も亢進する。2) Ay マウスの糖尿病の指標のうち、高インスリン血症が Tg×Ay で著明に改善すると同時に、Ay マウスの膵島の過形成が正常化した。3) 上記の事実から、膵島に局限した網羅的遺伝子発現解析を行い、PACAP 依存性に発現する形成制御因子として、RegIII $\beta$ 、過形成関連遺伝子として、1 つの機能未知の遺伝子を抽出した。4) これらの両遺伝子の細胞機能を、強制発現、RNAi ノックダウン法により検討中で、各々高いグルコース依存的細胞増殖を制御することを明らかにしている。

以上の知見は、内因性 PACAP が、インスリン分泌以外に、 $\beta$  細胞の増殖、膵島形成制御に係わる因子であることを示す。さらに、膵島の増殖、形成制御に関連する新しいシグナル系としての PACAP- 新規遺伝子の可能性を示すもので、糖尿



病の病態理解, 新しい創薬標的を提示する可能性も持つ。

### 3. 表現型解析からの機能分子評価へ

これまで述べた PACAP 遺伝子改変マウスの表現型解析から, 新たに導き出されるものをまとめる。まず, ヒト疾患への外挿については, PACAP シグナル系が統合失調症, ADHD の病態, あるいはその薬物治療機構に関与する可能性を提示した。統合失調症の動物モデルとして NMDA 受容体ノックダウン, NMDA 受容体拮抗薬のフェンシクリジン投与など, NMDA シナプス伝達の変異をもたらすものが知られている。統合失調症の陽性症状発現に係わるドーパミン神経伝達過剰説と陰性症状に関与するグルタミン酸神経伝達低下説が現在, 最も受け入れられている統合失調症の神経化学的変化である。一方, 統合失調症の脆弱遺伝子解析研究は, 代表的遺伝子としての最近の DISC1 の発見<sup>49)</sup>もあり, 現在, 世界中で精力的に行われている。これまでいくつかの候補遺伝子が挙げられているが, 新たな候補遺伝子として特定された PACAP について特筆すべきことは, 動物実験でのノックアウトの表現型と一致がみられることにある。ごく最近, PACAP が DISC1 とその会合蛋白 DBZ との会合を促進する興味ある知見を見い出した。<sup>50)</sup> DISC1 は最も確定的な統合失調症のリスク遺伝子として, その細胞機能の詳細の解明が待たれているところであるが, PACAP と DISC1 との機能的関連が明らかになれば, 統合失調症の発症, 治療における新しい研究方向を提示することにもつながる。一方, PACAP-KO が小児 ADHD にみられる機能異常, 特に精神運動興奮薬の治療機構を発現していると考えられる場合, 本研究は, 5-HT1A アゴニストが同疾患の薬物治療候補 (主剤あるいは, 補助薬剤) となる可能性を示唆する。5-HT1A アゴニストによるドーパミン, セロトニン, ノルアドレナリン, 各神経系の活性変化, と精神運動興奮薬の作用変化を解析する必要がある。

われわれは, 上述の表現型解析から, PACAP-KO で欠失する特定機能に関連すると予測される遺伝子をレーザーキャプチャー法による微小部位での網羅的遺伝子発現解析から検証した。その中で, 光による位相前進に係わる新たなシグナル分子としてのプロスタグランジン D2 を見い出している。また, 膵

臓については, PACAP 依存的に発現する膵島形成制御因子として, RegIII $\beta$ , 過形成関連遺伝子として, 機能未知の遺伝子を抽出した。これらの両遺伝子の細胞機能を詳細に検討中であるが, 膵島の増殖, 形成制御に関連する新しいシグナル系としての PACAP-新規遺伝子の可能性を示すものである。

以上, 概説したように, PACAP 遺伝子改変マウスの表現型解析から導き出された予測外の知見は, 特に, 脳において PACAP 神経がメジャーな神経回路の制御を通して高次脳機能に係わること, その変異がヒト精神疾患にも当てはまることを示すものである。統合失調症を始めとする多くの多因子性疾患は, 病態的にも複数の中間表現型により構成される。各々の中間表現型を構成する複数の脆弱因子を明らかにし, さらに, 発症に至る環境因子を同定していくことで, 新しい治療方向が開けてくる。このように, PACAP 遺伝子改変マウスの表現型の解析は, 疾患病態の分子基盤の理解をもたらすのみならず, 新しい創薬標的分子の提示にも結びつくものである。

**謝辞** 本研究は, 大阪大学薬学研究科神経薬理学分野において, これまで在籍した多くのスタッフ, 大学院生, 学生によってなされたものであり, かつ, 非常に多くの研究機関との共同研究により初めて実施が可能になったものである。併せて, 関係各位にこころからの謝意を表す。

### REFERENCES

- 1) Miyata A., Arimura A., Dahl R. R., Minami-no N., Uehara A., Jiang L., Culler M. D., Coy D. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 567-574 (1989).
- 2) Matsuda T., Takuma K., Baba A. *Jpn. J. Pharmacol.*, **74**, 1-20 (1997).
- 3) Takuma K., Baba A., Matsuda T., *Prog. Neurobiol.*, **72**, 111-127 (2004).
- 4) Matsuda T., Koyama Y., Baba A., *J. Pharmacol. Sci.*, **97**, 339-343 (2005).
- 5) Takuma K., Matsuda T., Hashimoto H., Asano S., Baba A., *Glia*, **12**, 336-342 (1994).
- 6) Matsuda T., Takuma K., Nishiguchi E., Asano S., Hashimoto H., Azuma J., Baba A., *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 951-958 (1996).
- 7) Matsuda T., Takuma K., Asano S., Kishida

- Y., Nakamura H., Mori K., Maeda S., Baba A., *J. Neurochem.*, **70**, 2004–2011 (1998).
- 8) Takuma K., Lee E., Kidawara M., Mori K., Kimura Y., Baba A., Matsuda T., *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 4204–4212 (1999).
- 9) Sakaue M., Nakamura H., Kaneko I., Kawasaki Y., Arakawa N., Hashimoto H., Koyama Y., Baba A., Matsuda T., *Brain Res.*, **881**, 212–216 (2000).
- 10) Arakawa N., Sakaue M., Yokoyama I., Hashimoto H., Koyama Y., Baba A., Matsuda T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, 354–357 (2000).
- 11) Matsuda T., Arakawa N., Takuma K., Kishida Y., Kawasaki Y., Sakaue M., Takahashi K., Takahashi T., Suzuki T., Ota T., Hamano-Takahashi A., Onishi M., Tanaka Y., Kameo K., Baba A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 249–256 (2001).
- 12) Sakaue M., Nakamura H., Kaneko I., Kawasaki Y., Arakawa N., Hashimoto H., Koyama Y., Baba A., Matsuda T., *Brain Res.*, **881**, 212–216 (2000).
- 13) Iwamoto T., Kita S., Uehara A., Imanaga I., Matsuda T., Baba A., Katsuragi T., *J. Biol. Chem.*, **279**, 7544–7553 (2004).
- 14) Luo X., Baba A., Matsuda T., Romano C., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**, 4576–4582 (2004).
- 15) Nagano T., Kawasaki Y., Baba A., Takemura M., Matsuda T., *J. Neurochem.*, **90**, 784–791 (2004).
- 16) Nagano T., Osakada M., Ago Y., Koyama Y., Baba A., Maeda S., Takemura M., Matsuda T., *Br. J. Pharmacol.*, **144**, 669–679 (2005).
- 17) Takahashi K., Takahashi T., Suzuki T., Onishi M., Tanaka Y., Hamano-Takahashi A., Ota T., Kameo K., Matsuda T., Baba A., *Eur. J. Pharmacol.*, **458**, 155–162 (2003).
- 18) Bouchard R., Omelchenko A., Le H. D., Choptiany P., Matsuda T., Baba A., Takahashi K., Nicoll D. A., Philipson K. D., Hnatowich M., Hryshko L. V., *Mol. Pharmacol.*, **65**, 802–810 (2004).
- 19) Lee C., Visen N. S., Dhalla N. S., Le H. D., Isaac M., Choptiany P., Gross G., Omelchenko A., Matsuda T., Baba A., Takahashi K., Hnatowich M., Hryshko L. V., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**, 748–757 (2004).
- 20) Bouwman R. A., Salic K., Padding F. G., Eringa E. C., van Beek-Harmsen B. J., Matsuda T., Baba A., Musters R. J. P., Paulus W. J., de Lange J. J., Boer C., *Circulation*, **114**, 226–I–232 (2006).
- 21) Bradley E., Hollywood M. A., Johnston L., Large R. J., Matsuda T., Baba A., McHale N. G., Thornbury K. D., Sergeant G. P., *J. Physiol.*, **574**, 651–661 (2006).
- 22) Reuter H., Henderson S. A., Han T., Matsuda T., Baba A., Ross R. S., Goldhaber J. I., Philipson K. D., *Circ. Res.*, **91**, 90–92 (2002).
- 23) Vaudry D., Gonzalez B. J., Basille M., Yon L., Fournier A., Vaudry H., *Pharmacol. Rev.*, **52**, 269–324 (2000).
- 24) Hashimoto H., Nogi H., Mori K., Ohishi H., Shigemoto R., Yamamoto K., Matsuda T., Mizuno N., Nagata S., Baba A., *J. Comp. Neurol.*, **371**, 567–577 (1996).
- 25) Nogi H., Hashimoto H., Hagihara N., Shimada S., Yamamoto K., Matsuda T., Tohyama M., Baba A., *Neurosci. Lett.*, **227**, 37–40 (1997).
- 26) Hashimoto H., Yamamoto K., Hagihara N., Ogawa N., Nishino A., Aino H., Nogi H., Imanishi K., Matsuda T., Baba A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1281**, 129–133 (1996).
- 27) Yamamoto K., Hashimoto H., Hagihara N., Nishino A., Fujita T., Matsuda T., Baba A., *Gene*, **211**, 63–69 (1998).
- 28) Hashimoto H., Nishino A., Shintani N., Hagihara N., Copeland N. G., Jenkins N. A., Yamamoto K., Matsuda T., Ishihara T., Nagata S., Baba A., *Genomics*, **58**, 90–93 (1999).
- 29) Hashimoto H., Ogawa N., Hagihara N., Yamamoto K., Imanishi K., Nogi H., Nishino A., Fujita T., Matsuda T., Nagata S., Baba A., *Mol. Pharmacol.*, **52**, 128–135 (1997).
- 30) Hashimoto H., Hagihara N., Koga K., Yamamoto K., Shintani N., Tomimoto S., Mori W., Koyama Y., Matsuda T., Baba A., *J. Neurochem.*, **74**, 501–507 (2000).
- 31) Sakai Y., Hashimoto H., Shintani N., Tomimoto S., Tanaka K., Ichibori A., Hirose M., Baba A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**, 656–661 (2001).
- 32) Sakai Y., Hashimoto H., Shintani N., Ichibori A., Tomimoto S., Tanaka K., Hirose M.,

- Baba A., *Regul. Pept.*, **109**, 149–153 (2002).
- 33) Hashimoto H., Kunugi A., Arakawa N., Shintani N., Fujita T., Kasai A., Kawaguchi C., Morita Y., Hirose M., Sakai Y., Baba A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 337–343 (2003).
- 34) Sakai Y., Hashimoto H., Shintani N., Katoh H., Negishi M., Kawaguchi C., Kasai A., Baba A., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **123**, 18–26 (2004).
- 35) Shintani N., Suetake S., Hashimoto H., Koga K., Kasai A., Kawaguchi C., Morita Y., Hirose M., Sakai Y., Tomimoto S., Matsuda T., Baba A., *Regul. Pept.*, **126**, 123–128 (2005).
- 36) Hashimoto H., Shintani N., Baba A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1070**, 75–89 (2006).
- 37) Hashimoto H., Shintani N., Tanaka K., Mori W., Hirose M., Matsuda T., Sakaue M., Miyazaki J., Niwa H., Tashiro F., Yamamoto K., Koga K., Tomimoto S., Kunugi A., Suetake S., Baba A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 13355–13360 (2001).
- 38) Hashimoto H., Shintani N., Nishino A., Okabe M., Ikawa M., Matsuyama S., Itoh K., Yamamoto K., Tomimoto S., Fujita T., Hagi-hara N., Mori W., Koyama Y., Matsuda T., Nagata S., Baba A., *J. Neurochem.*, **75**, 1810–1817 (2000).
- 39) Gray S. L., Cummings K. J., Jirik F. R., Sherwood N. M., *Mol. Endocrinol.*, **15**, 1739–1747 (2001).
- 40) Hamelink C., Tjurmina O., Damadzic R., Young W. S., Weihe E., Lee H. W., Eiden L. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 461–466 (2002).
- 41) Jamen F., Persson K., Bertrand G., Rodriguez-Henche N., Puech R., Bockaert J., Ahren B., Brabet P., *J. Clin. Invest.*, **105**, 1307–1315 (2000).
- 42) Hashimoto H., Shintani N., Baba A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 427–431 (2002).
- 43) Tanaka K., Shintani N., Hashimoto H., Kawagishi N., Ago Y., Matsuda T., Hashimoto R., Kunugi H., Yamamoto A., Kawaguchi C., Shimada T., Baba A., *J. Neurosci.*, **26**, 5091–5097 (2006).
- 44) Matsuyama S., Matsumoto A., Hashimoto H., Shintani N., Baba A., *Neuroreport*, **14**, 2095–2098 (2003).
- 45) Kawaguchi C., Tanaka K., Isojima Y., Shintani N., Hashimoto H., Baba A., Nagai K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**, 169–175 (2003).
- 46) Mabuchi T., Shintani N., Matsumura S., Okuda-Ashitaka E., Hashimoto H., Muratani T., Minami T., Baba A., Ito S., *J. Neurosci.*, **24**, 7283–7291 (2004).
- 47) Ohtaki H., Nakamachi T., Dohi K., Aizawa Y., Takaki A., Hodoyama K., Yofu S., Hashimoto H., Shintani N., Baba A., Kopf M., Iwakura Y., Matsuda K., Arimura A., Shioda S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 7488–7493 (2006).
- 48) Hashimoto R., Hashimoto H., Shintani N., Chiba S., Hattori S., Okada T., Nakajima M., Tanaka K., Kawagishi N., Nemoto K., Mori T., Ohnishi T., Noguchi H., Hori H., Suzuki T., Iwata N., Ozaki N., Nakabayashi T., Saitoh O., Kosuga A., Tatsumi M., Kamijima K., Weinberger D. R., Kunugi H., Baba A., *Mol. Psychiatry*, Mar 27 (2007) (epub. ahead of print).
- 49) Millar J. K., Wilson-Annan J. C., Anderson S., Christie S., Taylor M. S., Semple C. A. M., Devon R. S., StClair D. M., Muir W. J., Blackwood D. H. R., Dorteous D. J., *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1415–1423 (2000).
- 50) Hattori T., Baba K., Matsuzaki S., Honda A., Miyoshi K., Inoue K., Taniguchi M., Hashimoto H., Shintani N., Baba A., Shimizu S., Yukioka F., Kumamoto N., Yamaguchi A., Tohyama M., Katayama T., *Mol. Psychiatry*, **12**, 398–407 (2007).
- 51) Yaka R., He D.-Y., Phamluong K., Ron D., *J. Biol. Chem.*, **278**, 9630–9638 (2003).
- 52) Gainetdinov R. R., Wetsel W. C., Jones S. R., Levin E. D., Jaber M., Caron M. G., *Science*, **283**, 397–401 (1999).
- 53) Freson K., Hashimoto H., Thys C., Wittevrongel C., Danloy S., Morita Y., Shintani N., Tomiyama Y., Vermeylen J., Hoylaerts M. F., Baba A., Van Geet C., *J. Clin. Invest.*, **113**, 905–912 (2004).
- 54) Yada T., Sakurada M., Ihida K., Nakata M., Murata F., Arimura A., Kikuchi M., *J. Biol. Chem.*, **269**, 1290–1293 (1994).

- 
- 55) Arimura A., *Jpn. J. Physiol.*, **48**, 301–331 (1998).
- 56) Yamamoto K., Hashimoto H., Tomimoto S., Shintani N., Miyazaki J., Tashiro F., Aihara H., Nammo T., Li M., Yamagata K., Miyagawa J., Matsuzawa Y., Kawabata Y., Fukuyama Y., Koga K., Mori W., Tanaka K., Matsu-  
da T., Baba A., *Diabetes*, **52**, 1155–1162 (2003).
- 57) Tomimoto S., Hashimoto H., Shintani N., Yamamoto K., Kawabata Y., Hamagami K., Yamagata K., Miyagawa J., Baba A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 796–803 (2004).