

# ベルシェイプ型反応性および痙攣のリスクを軽減したAMPA受容体ポジティブアロステリックモジュレーターTAK-137の開発に関する研究

功刀, 章義

<https://doi.org/10.15017/4060096>

---

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (創薬科学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

博士論文

ベルシェイプ型反応性および痙攣のリスクを軽減した  
AMPA 受容体ポジティブアロステリックモジュレーター  
TAK-137 の開発に関する研究

功刀 章義

2020



## 目次

略語一覧	3
緒言	4
第1章 AMPA受容体 PAM LY451395、HBT1 および OXP1 の <i>in vitro</i> メカニズム解析に基づいた低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM の探索アプローチ	6
緒言	6
第1節 結果	6
1. 1. 1 LY451646 および LY451395 は初代神経細胞においてベルシェイプ型の BDNF 産生促進作用を示す	6
1. 1. 2 LY451395 は初代神経細胞を用いたパッチクラウンプアッセイや Ca <sup>2+</sup> 流入アッセイにおいてアゴニスト作用を有する	6
1. 1. 3 HBT1 は初代神経細胞においてアゴニスト依存的に AMPA 受容体を活性化し、LY451395 や OXP1 よりも広い濃度域で BDNF 産生促進作用を示す	8
1. 1. 4 HBT1 と LY451395 は異なる結合様式で AMPA 受容体の LBD に結合する	14
1. 1. 5 OXP1 は HBT1 と異なるサイトに結合する	17
1. 1. 6 OXP1 は AMPA 非存在下で HBT1 と AMPA 受容体の結合を促進し、AMPA 受容体を活性化する	20
第2節 考察	21
第3節 小括	22
第4節 実験方法	23
第2章 AMPA 受容体の S743 との立体障害による AMPA 受容体 PAM のアゴニスト作用の軽減	30
緒言	30
第1節 結果	30
2. 1. 1 Compound-1 は初代神経細胞において Compound-2 よりもアゴニスト作用が低い	30
2. 1. 2 Compound-1 は Compound-2 と異なり S743 での立体障害によりグルタミン酸依存的に AMPA 受容体に結合する	32
第2節 考察	36
第3節 小括	36
第4節 実験方法	36
第3章 ベルシェイプ型反応性および痙攣のリスクを軽減した低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM TAK-137	39
緒言	39

第1節 結果 .....	39
3.1.1 TAK-137 は LY451646 よりもアゴニスト作用が低い .....	39
3.1.2 TAK-137 はラットおよびサルにおいて強い認知改善作用を有する .....	43
3.1.3 TAK-137 はラットおよびサルにおいて広い安全域を有する .....	45
3.1.4 TAK-137 は LY451646 よりも広い用量域でげっ歯類の海馬神経前駆細胞の増殖を促進する .....	47
第2節 考察 .....	48
第3節 小括 .....	48
第4節 実験方法 .....	48
結論 .....	52
謝辞 .....	53
引用文献 .....	54
公表論文 .....	57

## 略語一覽

AMPA, alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid

ATD, amino-terminal domain

BDNF, brain-derived neurotrophic factor

CHO, Chinese hamster ovary

CTZ, cyclothiazide

DMSO, dimethyl sulfoxide

DMTS, delayed matching-to-sample

EC<sub>50</sub>, half maximal effective concentration

GluA1i CHO cells, GluA1i and TARPs  $\gamma$ 2 expressing CHO cells

HBSS, Hanks' Balanced Salt Solutions

HEK, human embryonic kidney

His-ATD, His-tagged GluA2o ATD protein

His-LBD, His-tagged GluA2o LBD protein

His-MIF, His-tagged macrophage migration inhibitory factor protein

IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration

LBD, ligand-binding domain

LDH, lactate dehydrogenase

MIF, macrophage migration inhibitory factor

NDI, novelty discrimination index

NORT, novel object recognition test

NSB, non-specific binding

SPA, scintillation proximity assay

TARPs, transmembrane AMPA-R regulatory proteins

## 緒言

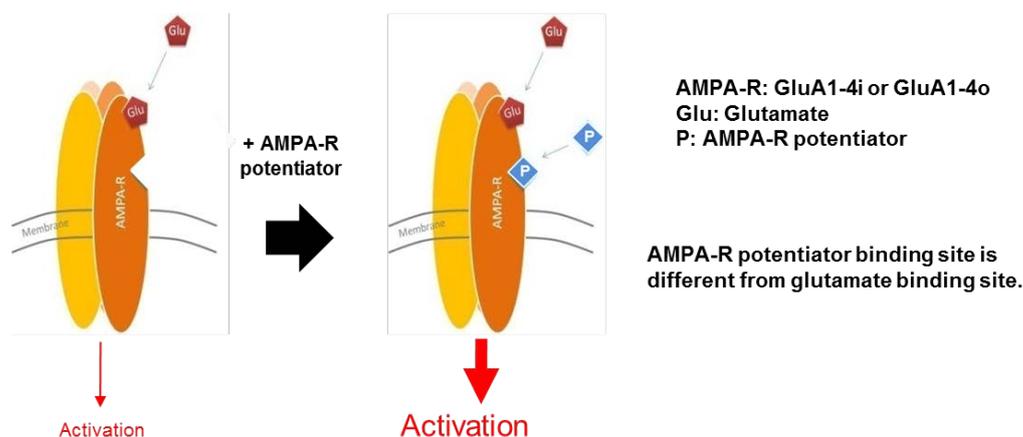
これまで開発されてきた多くの薬剤はターゲット分子のオルソステリック部位に直接結合することによりその機能を調節している。しかし、オルソステリック部位の構造はターゲット分子のファミリーあるはサブタイプ間で類似性が高いため、オルソステリック部位に作用する薬剤はターゲットへの特異性を得ることが難しく、副作用を有する懸念がある。一方、アロステリック部位はターゲット分子のサブタイプ間での構造の類似性が低いため、ターゲットへの特異性を得ることが可能であると考えられる。そのため、近年、アロステリック部位に作用する薬剤の開発が注目されている<sup>1</sup>。Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) 受容体を含むいくつかの中枢疾患治療薬のターゲット分子はアロステリック部位を有することが報告されており<sup>1-3</sup>、アロステリック部位に作用する中枢疾患治療薬の開発アプローチは強い薬効を有し、副作用が少ない薬剤の開発に繋がることを期待される。

AMPA 受容体は中枢神経系において速い興奮性神経伝達を担う重要なイオンチャネル型グルタミン酸受容体である<sup>4</sup>。AMPA 受容体は4つのサブユニット(GluA1-4)から構成されるテトラマーで(Figure 1)、それぞれが flip (i) と flop (o) と呼ばれるスプライシングバリエーションを持つ<sup>5-9</sup>。AMPA 受容体の構造は複雑で、GluA2 は RNA 編集によるグルタミンからアルギニンへの変換が生じている部位(Q/R 部位)を有しており、さらに、AMPA 受容体は Transmembrane AMPA-R regulatory proteins (TARPs) などの補助サブユニットと複合体を形成する<sup>10-12</sup>。AMPA 受容体サブユニットの細胞外部位は Ligand-binding domain (LBD) と Amino-terminal domain (ATD) の2つのドメインで構成されており、LBD にグルタミン酸結合部位が存在する<sup>13</sup>。AMPA 受容体は学習や記憶を形成するための基本的神経機能であるシナプス可塑性において重要な役割を担っている<sup>14</sup>。実際、AMPA 受容体ポジティブアロステリックモジュレーター (AMPA 受容体 PAM) は種々の認知機能試験において改善作用を示すことが報告されている<sup>12,13</sup>。重要なことに AMPA 受容体 PAM は Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 産生を促進するため<sup>2</sup>、神経栄養作用と神経保護作用も有する<sup>3,15</sup>。BDNF はうつ病などの精神疾患の病態生理に関与すると考えられていることから、AMPA 受容体 PAM は精神疾患および神経変性疾患に対する有望な治療薬になると考えられる<sup>16</sup>。

すべての AMPA 受容体を活性化することができる AMPA 受容体アゴニストは、受容体の脱感作や痙攣を誘導する<sup>17-19</sup>。一方、AMPA 受容体 PAM はアゴニスト結合部位(グルタミン酸結合部位)には結合せずに、アロステリック結合部位に作用することで、脳内の生理的な受容体の活性化を選択的に促進する(Figure 1)。そのため、AMPA 受容体 PAM はアゴニストと比較して、受容体の脱感作や痙攣のリスクが低いと考えられる。しかし、これまでに報告されている AMPA 受容体 PAM LY451646、LY451395、S18986 は種々の薬理試験においてベルシェイプ型の反応性を示すことが報告されている<sup>20-22</sup>。また、私は LY451646 がラット認知機能試験において認知改善作用を示す用量の10倍高い用量で痙攣を起こすことを見出した。これらのリスクは、ヒトの遺伝的背景や代謝などの heterogeneity を考えると、臨床

試験においてはより深刻な問題となりうる。そのため、ベルシェイプ型の反応性および痙攣リスクを軽減した AMPA 受容体 PAM を見出すことは AMPA 受容体 PAM を中枢疾患治療薬として開発する上で重要である。

そこで本論文第 1 章では、ベルシェイプ型の反応性および痙攣リスクを軽減した AMPA 受容体 PAM を発見するために、AMPA 受容体 PAM LY451395、HBT1 および OXP1 の *in vitro* メカニズム解析を行った。その結果、ベルシェイプ型の反応性は、アゴニスト活性が関与することを見出した。そして、低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM の探索には、受容体への結合様式とその機能的表現系の関係を考慮した化合物の最適化が重要であることが示唆された。第 2 章では、それらの知見に基づき、化合物スクリーニングを実施し、dihydropyridothiadiazine 2,2-dioxides 骨格を有する新規 AMPA 受容体 PAM を見出した。そして、その誘導体化合物の受容体への結合様式の解析から、AMPA 受容体の 743 番目のセリンと立体障害を有することがアゴニスト性の低減に重要であることを見出した。第 3 章では、その知見に基づいて化合物の最適化を行い、低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM TAK-137 を見出した。そして、TAK-137 はベルシェイプ型の反応性および痙攣リスクが既存の AMPA 受容体 PAM と比較して低減していることを確認した。



**Figure 1** AMPA receptor (AMPA-R) structure and mechanism of action of AMPA-R potentiator (AMPA-R PAM)

## 第1章 AMPA受容体 PAM LY451395、HBT1 および OXP1 の *in vitro* メカニズム解析に基づいた低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM の探索アプローチ

### 緒言

AMPA受容体PAMの創成において、ベルシェイプ型の反応性を軽減することが重要である。本章では、LY451395、HBT1 および OXP1 の *in vitro* メカニズム解析からベルシェイプ型の反応性のメカニズムおよびそれを回避するスクリーニングアプローチについて考察した。

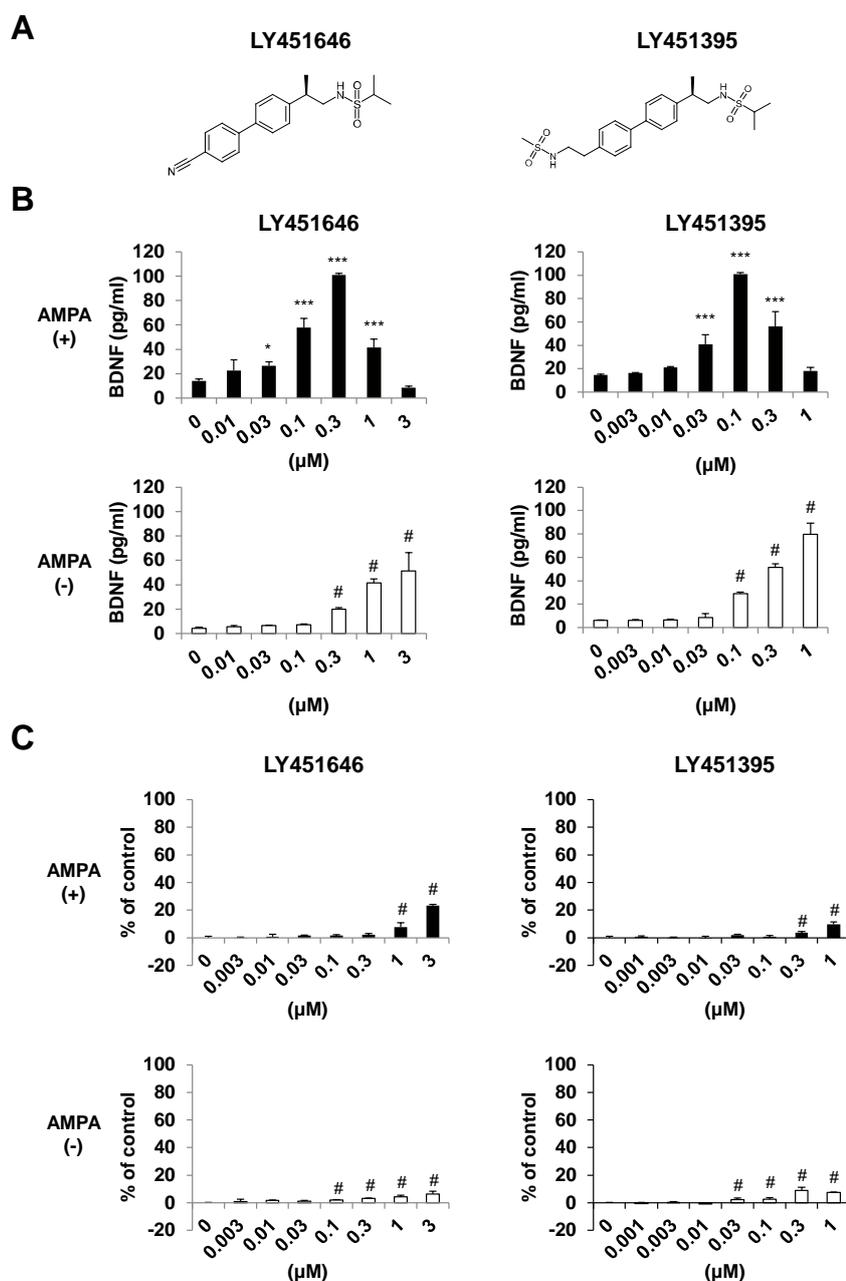
### 第1節 結果

#### 1. 1. 1 LY451646 および LY451395 は初代神経細胞においてベルシェイプ型の BDNF 産生促進作用を示す

LY451646 (Figure 2A) はラット海馬においてベルシェイプ型の BDNF mRNA 発現促進作用を有することが報告されている<sup>23</sup>。そこで、私は初代神経細胞における BDNF 産生に対する LY451646 の作用について調べた。その結果、LY451646 は既報の *in vivo* 試験と同様にベルシェイプ型の BDNF 産生促進作用を示した (Figure 2B)。LY451646 の最大効果は  $0.3 \mu\text{M}$  で観察されたが、それ以上の濃度ではその作用は減弱した。また、LY451646 と類似構造を有する AMPA 受容体 PAM LY451395 (Figure 2A) も同様にベルシェイプ型の反応性を示した (Figure 2B)。LY451395 の最大効果は  $0.1 \mu\text{M}$  で観察されたが、それ以上の濃度ではその作用は減弱した。興味深いことに、LY451646 および LY451395 は AMPA 非存在下でもそれぞれ  $0.3\text{-}3 \mu\text{M}$  および  $0.1\text{-}1 \mu\text{M}$  で BDNF 産生作用を示し (Figure 2B)、アゴニスト作用 (アゴニスト (AMPA) 非存在下での活性) を有することが示唆された。また、両化合物のベルシェイプ型の反応性はアゴニスト活性を示す濃度から認められることが分かった。また、細胞外への lactate dehydrogenase (LDH) 放出を指標に両化合物の細胞毒性を調べたところ<sup>24</sup>、本試験系においては、LY451646 は  $1 \mu\text{M}$  までは AMPA 存在下および非存在下ではほとんど細胞毒性は示さなかった (Figure 2C)。同様に、LY451395 も AMPA 存在下および非存在下ではほとんど細胞毒性は示さなかった (Figure 2C)。これらのことから、細胞毒性はベルシェイプ型の反応性に影響していないと考えられた。LY451646 および LY451395 は BDNF アッセイにおいて類似の作用を有していたことから、さらなる *in vitro* 解析には LY451395 を用いることにした。

#### 1. 1. 2 LY451395 は初代神経細胞を用いたパッチクラウンプアッセイや $\text{Ca}^{2+}$ 流入アッセイにおいてアゴニスト作用を有する

BDNF アッセイでは神経細胞に LY451646 あるいは LY451395 を長時間 (24 時間) 処置しているため、観察されたアゴニスト作用が化合物本来の作用ではなく、間接的な作用の可能



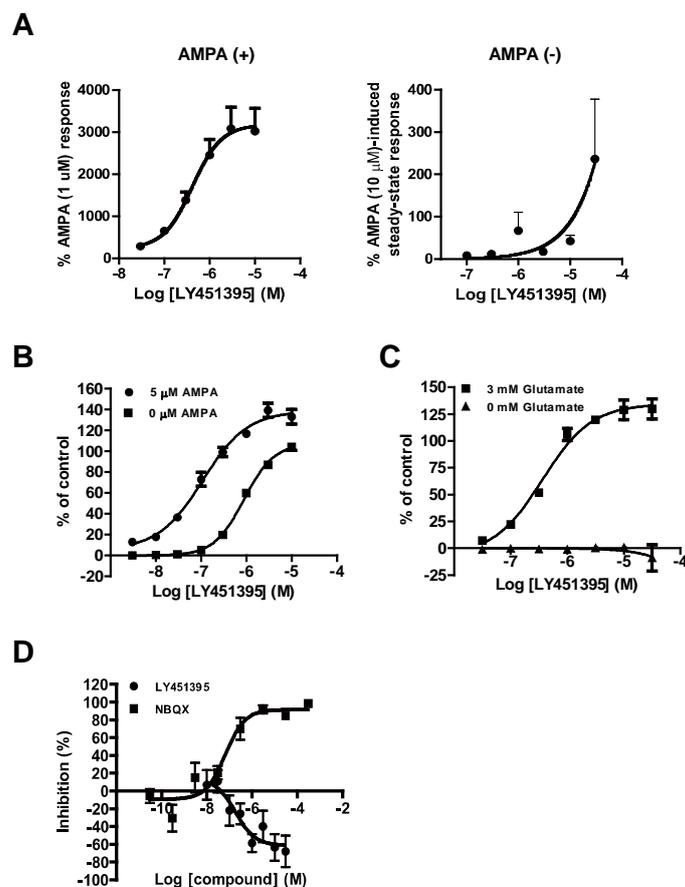
**Figure 2** LY451646 and LY451395 showed a bell-shaped response for BDNF protein production in primary neurons in the presence of agonist. (A) Chemical structures of LY451646 and LY451395. (B, C) Effects of LY451646 and LY451395 on BDNF protein levels in primary neurons (B) and LDH release from primary neurons (C). Cells were treated with LY451646 and LY451395 for 24 h in the presence (black bar) or absence (white bar) of 1  $\mu$ M AMPA. Data are presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . Concentration-dependent effects of test compounds were statistically analyzed using the one-tailed Williams' test ( $^{\#}P \leq 0.025$ ; versus control group). Statistical significance of differences between control and test compounds in the BDNF assay using AMPA was determined using Dunnett's test ( $^*P \leq 0.05$ ,  $^{***}P \leq 0.001$ ).

性も考えられる (Figure 2B)。そのため、私は LY451395 自身がアゴニスト作用を有するの  
かを検討するため、パッチクランプアッセイを実施した。その結果、LY451395 は初代神経  
細胞において AMPA 存在下および非存在下の両方の条件で AMPA 受容体を介した電流を増加  
させた (Figure 3A)。このことから、私はアゴニスト作用がベルシェイプ型反応性と関連す  
るという仮説を立て、アゴニスト性の低い AMPA 受容体 PAM の探索を試みた。パッチクラン  
プアッセイや BDNF アッセイはスループットが悪く、労力がかかるため、化合物スクリー  
ニングには適していない。そこで、私は AMPA 受容体発現した細胞株および初代神経細胞を用  
いた  $\text{Ca}^{2+}$  流入アッセイで LY451395 の評価を行った。驚いたことに、LY451395 は初代神経細  
胞においては AMPA の存在下および非存在下の両方で  $\text{Ca}^{2+}$  流入を誘導したが (Figure 3B)、  
GluA1i と TARPs  $\gamma 2$  を共発現した Chinese hamster ovary (CHO) 細胞 (GluA1i CHO 細胞)  
では、グルタミン酸存在下でのみ  $\text{Ca}^{2+}$  流入を誘導した (Figure 3C)。初代神経細胞における  
LY451395 の Half maximal effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) は  $0.11 \mu\text{M}$  (AMPA 有り) と  $0.88$   
 $\mu\text{M}$  (AMPA 無し)、GluA1i CHO 細胞では  $0.37 \mu\text{M}$  であった。これらのことから、化合物ス  
クリーニングに広く使われている AMPA 受容体発現細胞株を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  流入アッセイは低ア  
ゴニスト作用を有する AMPA 受容体 PAM の探索には適さないと考えられた。次に、私は  
LY451395 が AMPA 受容体のグルタミン酸結合部位に結合してアゴニスト活性を示しているの  
かを調べた。 $[\text{H}]$ -AMPA とラット海馬膜画分を用いた結合競合実験において、LY451395 は  
 $[\text{H}]$ -AMPA の海馬膜画分に対する結合を阻害せず、AMPA 受容体のアンタゴニストである NBQX  
はその結合を阻害した (Figure 3D)。これまで報告された AMPA 受容体 PAM はリガンドの AMPA  
受容体への結合を促進することが知られており<sup>25</sup>、本研究においても、LY451395 は  $[\text{H}]$ -AMPA  
の海馬膜画分に対する結合を促進した。以上の結果から、LY451395 はアゴニスト非存在下  
の初代神経細胞においてアロステリックに AMPA 受容体を活性化することが示唆された。

### 1. 1. 3 HBT1 は初代神経細胞においてアゴニスト依存的に AMPA 受容体を活性化し、 LY451395 や OXP1 よりも広い濃度域で BDNF 産生促進作用を示す

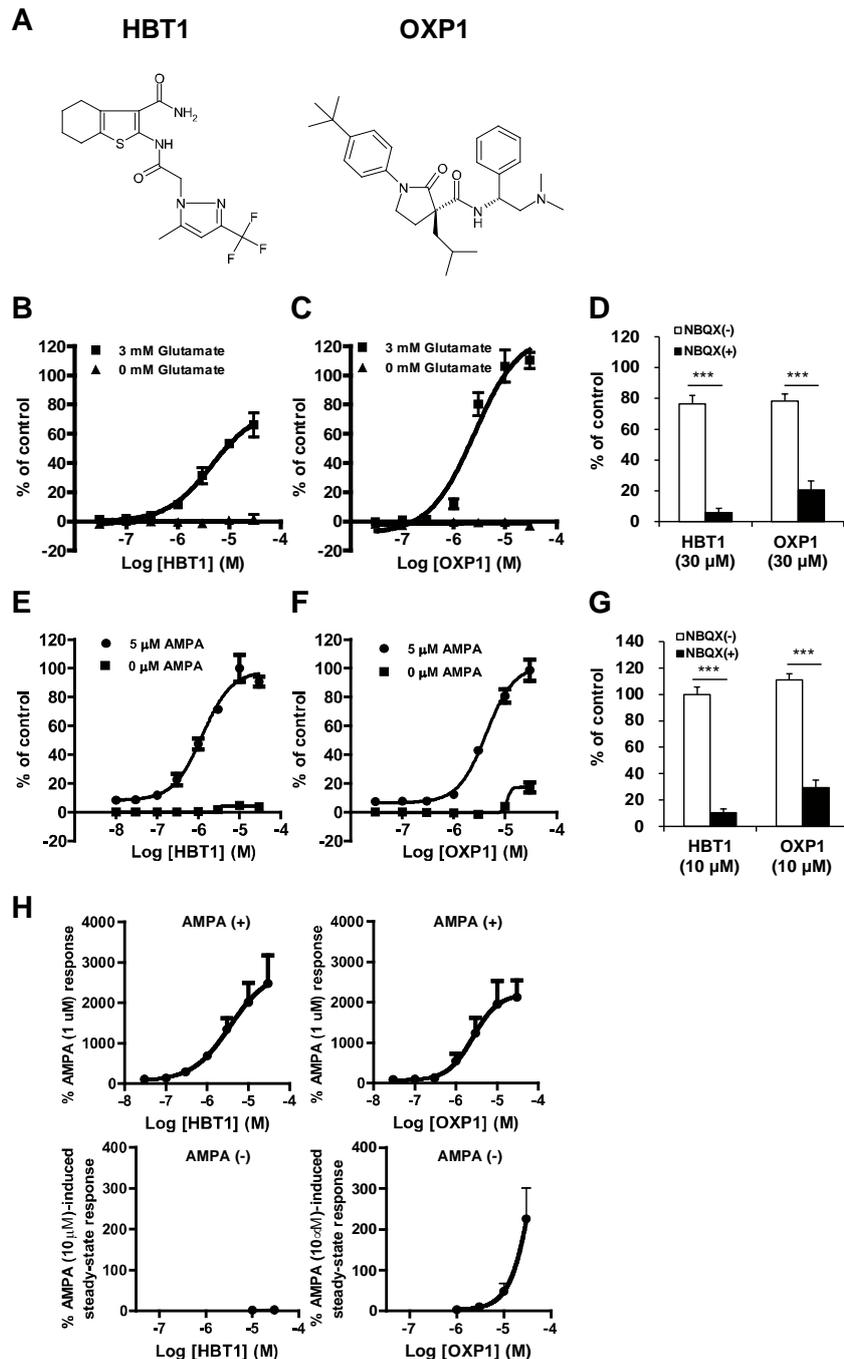
初代神経細胞において低アゴニスト性作用を有する新規 AMPA 受容体 PAM を探索するた  
めに、まず GluA1i CHO 細胞を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  流入アッセイで化合物スクリーニングを行い、その  
後、初代神経細胞を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  流入アッセイでヒット化合物のアゴニスト活性について調べ  
た。その結果、2 つの新規 AMPA 受容体 PAM HBT1、OXP1 (Figure 4A) を見出した。

HBT1 と OXP1 はともに GluA1i CHO 細胞においてグルタミン酸依存的に  $\text{Ca}^{2+}$  流入を誘導し、



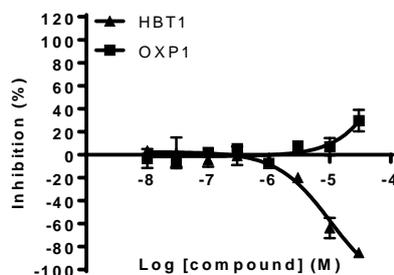
**Figure 3** LY451395 showed agonistic effects in primary neurons, but not in GluA1i CHO cells. (A) Effects of LY451395 on AMPA receptor-mediated currents in the presence or absence of 1  $\mu$ M AMPA in a patch-clamp study using primary neurons. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 4-9). (B) Effects of LY451395 on Ca<sup>2+</sup> influx in primary neurons in the presence or absence of 5  $\mu$ M AMPA. (C) Effects of LY451395 on Ca<sup>2+</sup> influx in GluA1i CHO cells in the presence or absence of 3 mM glutamate. (D) Effects of LY451395 and NBQX on the binding of [<sup>3</sup>H]-AMPA to rat hippocampal membranes. Data are presented as mean  $\pm$  SD, n=3-4.

EC<sub>50</sub> はそれぞれ 4.6  $\mu$ M、2.5  $\mu$ Mであった (Figure 4B, 4C)。また、それら化合物の活性は AMPA 受容体アンタゴニストである NBQX によって抑制された (Figure 4D)。HBT1 と OXP1 はともに初代神経細胞において AMPA 依存的に Ca<sup>2+</sup>流入を誘導し、EC<sub>50</sub> はそれぞれ 1.3  $\mu$ M、4.3  $\mu$ Mであった (Figure 4E, 4F)。また、それら化合物の活性は NBQX によって抑制された (Figure 4G)。興味深いことに、HBT1 は初代神経細胞を用いたパッチクランプアッセイにおいて AMPA 存在下でのみ AMPA 受容体を介した電流を誘導したが、OXP1 は AMPA 存在下および非存在下の両方で AMPA 受容体を介した電流を誘導した (Figure 4H)。



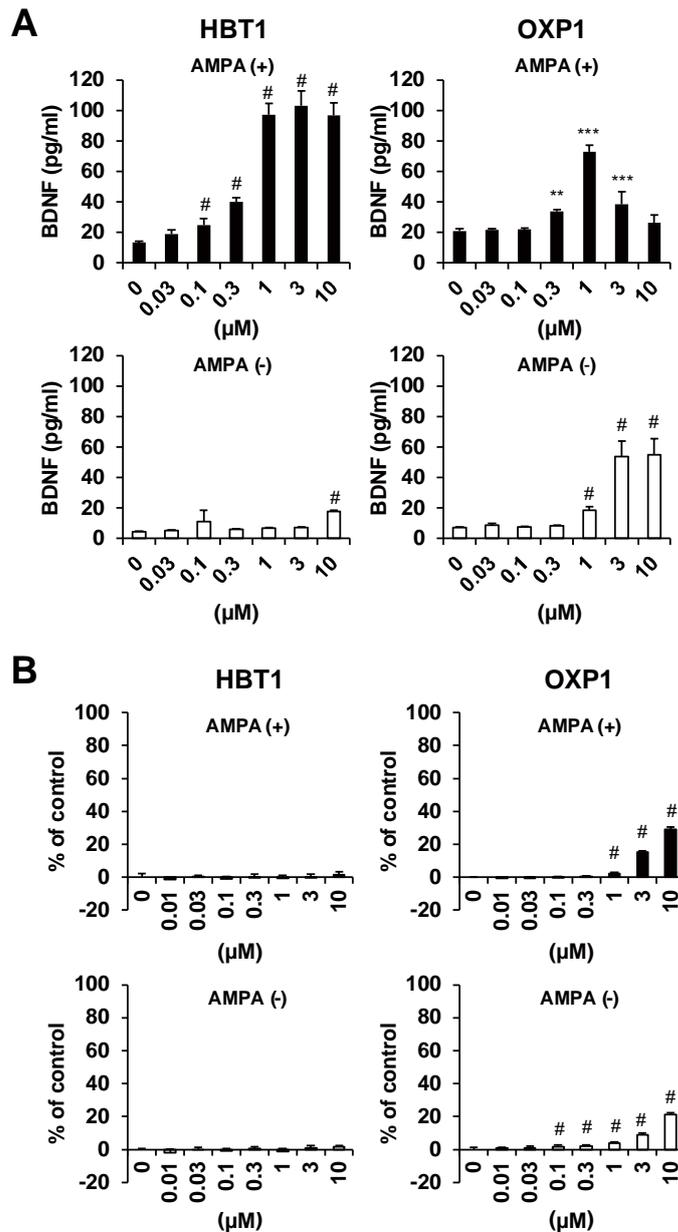
**Figure 4** HBT1 activated AMPA-R in an agonist-dependent manner (A) Chemical structure of HBT1 and OXP1. (B, C) Effects of HBT1 (B) and OXP1 (C) on  $\text{Ca}^{2+}$  influx in GluAi CHO cells in the presence or absence of 3 mM glutamate. (D) Effects of 100  $\mu\text{M}$  NBQX on the induction of  $\text{Ca}^{2+}$  influx by HBT1 or OXP1 in the presence of 10  $\mu\text{M}$  glutamate. (E, F) Effects of HBT1 (E) and OXP1 (F) on  $\text{Ca}^{2+}$  influx in primary neurons in the presence or absence of 5  $\mu\text{M}$  AMPA. (G) Effects of 10  $\mu\text{M}$  NBQX on the induction of  $\text{Ca}^{2+}$  influx by 10  $\mu\text{M}$  HBT1 or 10  $\mu\text{M}$  OXP1 in the presence of 5  $\mu\text{M}$  AMPA. (H) Effects of HBT1 and OXP1 on AMPA receptor-mediated currents in the presence or absence of 1  $\mu\text{M}$  AMPA in a patch-clamp study using primary neurons. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 4-9$ ). Other data (B-G) are presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . The statistical significance of differences between NBQX (-) and NBQX (+) in (D) and (G) was determined using Aspin-Welch's  $t$ -test or Student's  $t$ -test ( $***P \leq 0.001$ ).

[<sup>3</sup>H]-AMPA とラット海馬膜画分を用いた結合競合実験において、HBT1 と OXP1 は [<sup>3</sup>H]-AMPA のラット海馬膜画分への結合を阻害しなかった (Figure 5)。これらの結果から OXP1 は初代神経細胞においてアゴニスト非存在下ではアロステリックに AMPA 受容体を活性化することが示唆された。



**Figure 5** Effects of HBT1 and OXP1 on the binding of [<sup>3</sup>H]-AMPA to rat hippocampal membranes. Data are presented as mean ± SD, n=3.

次に、初代神経細胞における HBT1 と OXP1 の BDNF 産生促進作用について検討を行った。HBT1 は AMPA 存在下で濃度依存的に BDNF 産生を促進し、その最大活性は 1-10 μM の濃度域で維持された (Figure 6A)。また、HBT1 は AMPA 非存在下では 3 μM まで BDNF 産生促進作用を示さなかった (Figure 6A)。OXP1 は AMPA 存在下ではベルシェイプ型の反応を示し、1 μM で最大作用を示したが、それよりも高い濃度ではその作用が減弱した (Figure 6A)。AMPA 非存在下では、OXP1 は 1 μM 以上の濃度において BDNF 産生促進作用を示した (Figure 6A)。LY451646 や LY451395 と同様に、OXP1 のベルシェイプ型の反応はアゴニスト活性を示す濃度から認められた。HBT1 は AMPA 存在下および非存在下の両方の条件において細胞毒性は示さなかったが、OXP1 は 1-10 μM (AMPA あり) と 0.1-10 μM (AMPA なし) で僅かではあるが有意に細胞毒性を示した (Figure 6B)。以上のことから、HBT1 が LY451395 や OXP1 よりもアゴニスト作用が低く、このことが初代神経細胞における BDNF 産生作用のベルシェイプ型の反応性のリスクの低下に関連していることが示唆された。



**Figure 6** Effects of HBT1 and OXP1 on BDNF protein levels in primary neurons (A) and LDH release from primary neurons (B). Cells were treated with HBT1 or OXP1 for 24 h in the presence (black bar) or absence (white bar) of AMPA (1  $\mu$ M). Data are presented as mean  $\pm$  SD, n = 3. Concentration-dependent effects of test compounds were statistically analyzed using the one-tailed Williams' test (<sup>#</sup>P  $\leq$  0.025; versus control group). Statistical significance of differences between control and OXP1 in the BDNF assay using AMPA was determined using Dunnett's test (<sup>\*\*</sup>P  $\leq$  0.01, <sup>\*\*\*</sup>P  $\leq$  0.001).

それぞれの AMPA 受容体サブユニットは異なる機能を有し、AMPA 受容体 PAM のサブユニット選択性はそれらの機能に影響する可能性がある<sup>26</sup>。そのため、私は GluA1-4i と TARPs  $\gamma$ 2 あるいは GluA1-4o と TARPs  $\gamma$ 2 を発現させた CHO 細胞を用いて Ca<sup>2+</sup>流入アッセイを行い、HBT1 と OXP1 のサブユニット選択性を調べた。Table 1 に示すように、HBT1 と OXP1 はほと

んどサブユニット選択性を示さなかった。また、私はこれら 2 化合物が 100  $\mu\text{M}$  までカイン酸受容体 (GluK1, GluK2) を活性化しないことを確認した。

さらに HBT1 と OXP1 の違いを調べるために、GluA1i CHO 細胞においてそれぞれの化合物が AMPA 受容体活性化に必要とするグルタミン酸濃度について検討した。興味深いことに、HBT1 と OXP1 の AMPA 受容体の活性化に必要なグルタミン酸濃度の  $\text{EC}_{50}$  はそれぞれ 2.5  $\mu\text{M}$  と 0.25  $\mu\text{M}$  で、HBT1 は OXP1 よりも高い濃度のグルタミン酸が AMPA 受容体活性化のためには必要であった (Figure 7)。このことから、HBT1 と OXP1 は AMPA 受容体活性化の様式が異なる可能性が示唆された。

**Table 1**  $\text{EC}_{50}$  values ( $\mu\text{M}$ ) of HBT1 and OXP1 in the  $\text{Ca}^{2+}$  influx assay using CHO cells expressing GluA1-4i + TARPs  $\gamma 2$  or expressing GluA1-4o + TARPs  $\gamma 2$ , or using CHO cells expressing GluK1 or GluK2.

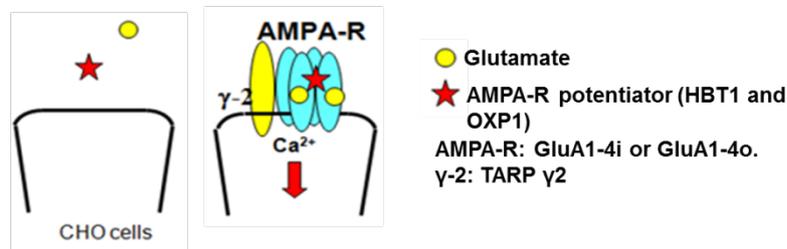
	GluA1i	GluA2i	GluA3i	GluA4i	GluA1o	GluA2o	GluA3o	GluA4o
HBT1	4.6	1.1	1.5	6.5	2.8	0.3	12	2.8
OXP1	2.5	2.7	2.4	5.2	5.0	2.0	7.4	5.2

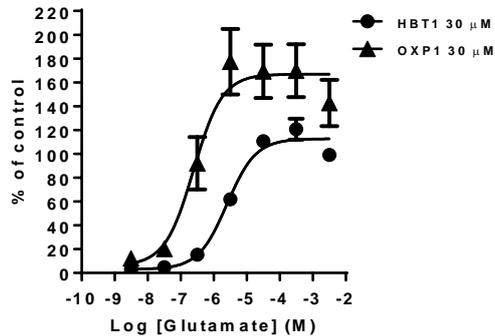
  

	GluK1	GluK2
HBT1	> 100	> 100
OXP1	> 100	> 100

(Table 1 の実験の補足図)

**$\text{Ca}^{2+}$  influx assay using CHO cells expressing AMPA-R + TARPs  $\gamma 2$**

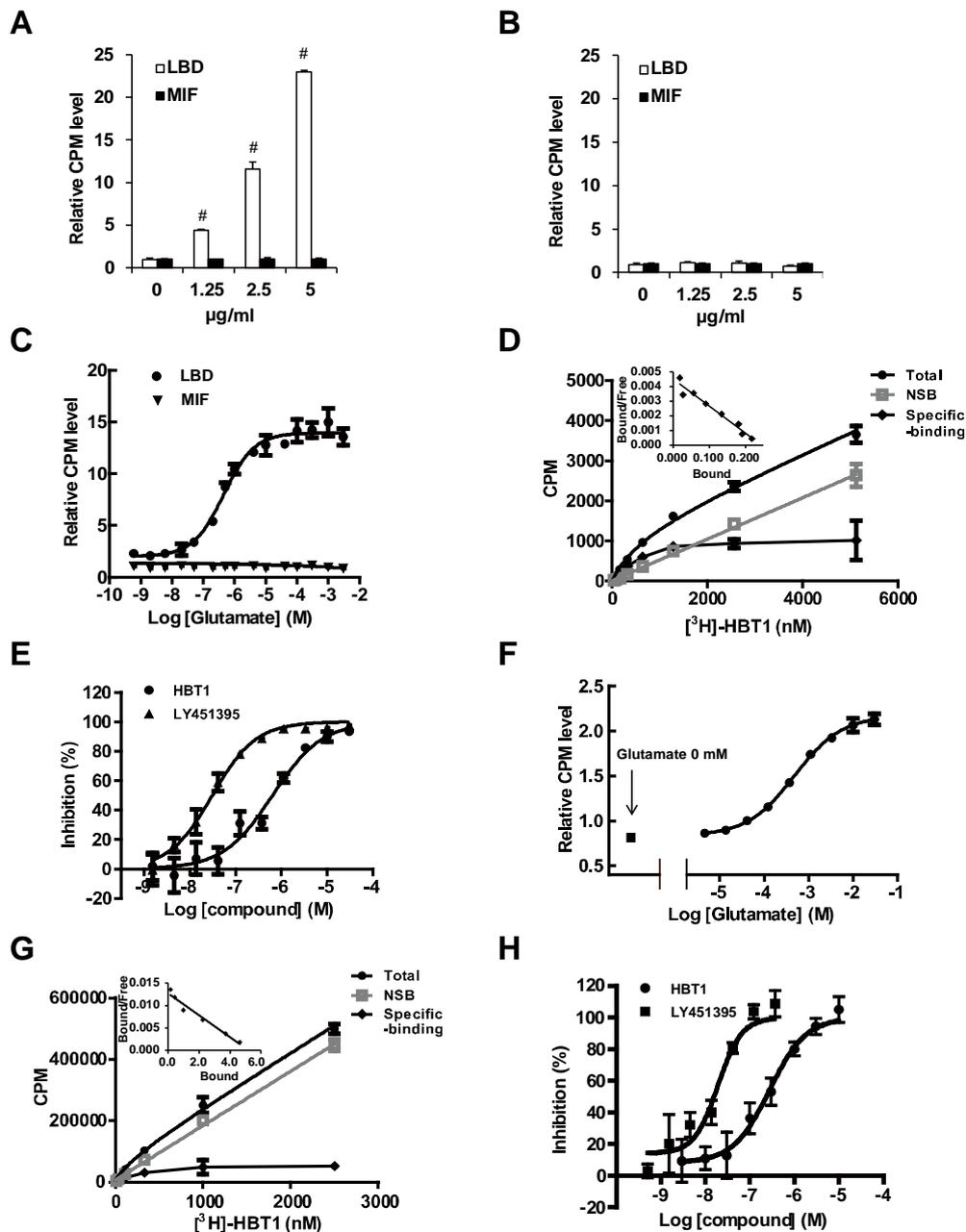




**Figure 7** Concentration of glutamate required for the induction of  $\text{Ca}^{2+}$  influx by 30  $\mu\text{M}$  HBT1 and 30  $\mu\text{M}$  OXP1 in GluA1i CHO cells. Data is presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

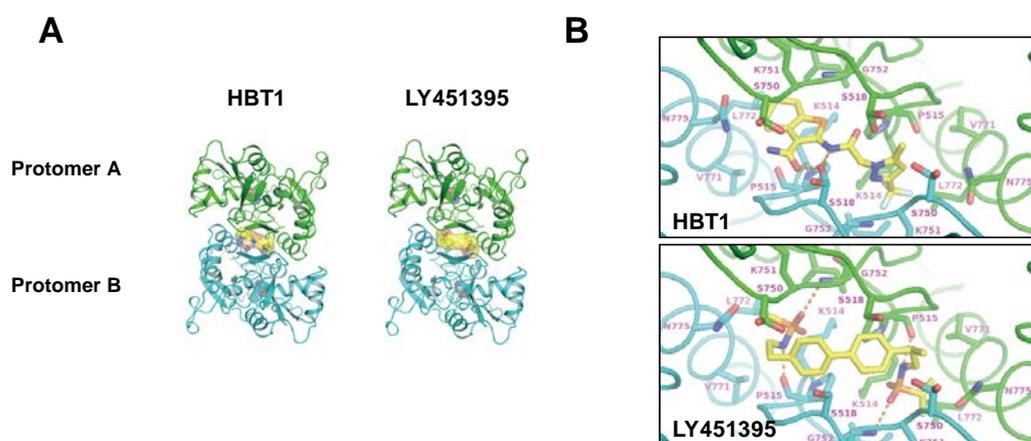
#### 1. 1. 4 HBT1 と LY451395 は異なる結合様式で AMPA 受容体の LBD に結合する

HBT1 と OXP1 の結合特性について検討を行った。AMPA 受容体の LBD のダイマーの境界面に形成される疎水性ポケットは AMPA 受容体 PAM の結合ポケットとして知られている<sup>13,27</sup>。次に放射性ラベルした  $^3\text{H}$ -HBT1 と His-tagged GluA2o LBD タンパク質 (His-LBD) を用いた Scintillation proximity assay (SPA) で HBT1 と LBD の相互作用を調べた。100  $\mu\text{M}$  のグルタミン酸存在下で  $^3\text{H}$ -HBT1 と His-LBD の特異的な結合が検出されたが、コントロールとして His-tagged macrophage migration inhibitory factor (His-MIF) を用いた場合は、 $^3\text{H}$ -HBT1 の特異的な結合は検出されなかった (Figure 8A)。このことから HBT1 は特異的に Glu2o LBD に結合することが示唆された。OXP1 と His-LBD の結合についても、 $^3\text{H}$ -OXP1 と His-LBD を用いた SPA で検討を行ったが、実施した実験条件下では  $^3\text{H}$ -OXP1 と His-LBD の特異的な結合は検出されなかった (Figure 8B)。次に、 $^3\text{H}$ -HBT1 と His-LBD の結合に対するグルタミン酸の影響を検討した。グルタミン酸は濃度依存的に  $^3\text{H}$ -HBT1 の His-LBD への結合を増加させた (Figure 8C)。そのため、HBT1 はグルタミン酸依存的に AMPA 受容体の LBD に結合することが示唆された。 $^3\text{H}$ -HBT1 の His-LBD への結合親和性を調べたところ、 $K_d$  値は 543 nM であった (Figure 8D)。また、 $^3\text{H}$ -HBT1 と His-LBD を用いた SPA による競合結合阻害アッセイにおいては、HBT1 と LY451395 の  $\text{IC}_{50}$  はそれぞれ 0.64  $\mu\text{M}$  と 0.03  $\mu\text{M}$  であった (Figure 8E)。さらに  $^3\text{H}$ -HBT1 のネイティブ AMPA 受容体への結合をラット海馬膜画分を用いて検討を行った。ラット海馬膜画分への  $^3\text{H}$ -HBT1 の結合はグルタミン酸の濃度依存的に増加し、その結合はグルタミン酸非存在下では認められなかった (Figure 8F)。 $^3\text{H}$ -HBT1 のラット膜画分に対する結合親和性を調べたところ、 $K_d$  値は 416 nM であった (Figure 8G)。また、 $^3\text{H}$ -HBT1 とラット海馬膜画分を用いた競合結合阻害アッセイにおいて、HBT1 と LY451395 の  $\text{IC}_{50}$  はそれぞれ 0.28  $\mu\text{M}$  と 0.02  $\mu\text{M}$  であった (Figure 8H)。



**Figure 8** HBT1 and LY451395 bound to a pocket in the LBD of AMPA-R. (A) SPA measurement of selective  $[^3\text{H}]\text{-HBT1}$  binding to His-tagged GluA2o LBD (His-LBD). The 6His-tagged human MIF (His-MIF) was used as a control protein. (B) SPA measurement of selective  $[^3\text{H}]\text{-OXP1}$  binding to His-LBD. (C) Effects of glutamate on the binding of  $[^3\text{H}]\text{-HBT1}$  to His-LBD. (D) Analysis of saturation isotherms with  $[^3\text{H}]\text{-HBT1}$  indicating a single saturable binding site in His-LBD. (E) Displacement studies with HBT1 and LY451395 using SPA with  $[^3\text{H}]\text{-HBT1}$  and His-LBD. (F) Effects of glutamate on the binding of  $[^3\text{H}]\text{-HBT1}$  to hippocampal membranes. (G) Analysis of saturation isotherms with  $[^3\text{H}]\text{-HBT1}$  disclosing a single saturable binding site in rat hippocampal membranes. (H) Displacement studies with HBT1 and LY451395 using the binding assay with  $[^3\text{H}]\text{-HBT1}$  and rat hippocampal membranes. Data are presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 3-4$ . Concentration-dependent effects of His-LBD in (A) and (B) were statistically analyzed using the one-tailed Williams' test ( $^{\#}P \leq 0.025$ ; versus control group).

一方、HBT1 と LBD の構造的な相互作用を調べるため、GluA2o LBD/glutamate/HBT1 複合体と GluA2o LBD/glutamate/LY451395 複合体の結晶構造解析を行った。HBT1 と LY451395 は 2 つの Protomer の間のダイマー境界面に形成されるポケットに化合物と Protomer の量比が 1 : 2 で結合した (Figure 9A)。この構造を基に HBT1 と LY451395 の LBD のアミノ酸残基との相互作用について調べた。HBT1 は Trifluoromethylpyrazole と Tetrahydrobenzophenone がダイマー境界面の 2 つの疎水ポケットを占有し、LY451395 は 2 つの sulfonamide が占有していた (Figure 9B)。HBT1 は S518 の側鎖と 2 つの水素結合を形成していた (Figure 9B)。LY451395 の sulfonamide は両方のポケットにある P515 と G752 の主鎖原子と水素結合を形成していた (Figure 9B)。これらのことから、HBT1 と LY451395 は LBD に異なる結合様式で結合していることがわかった。

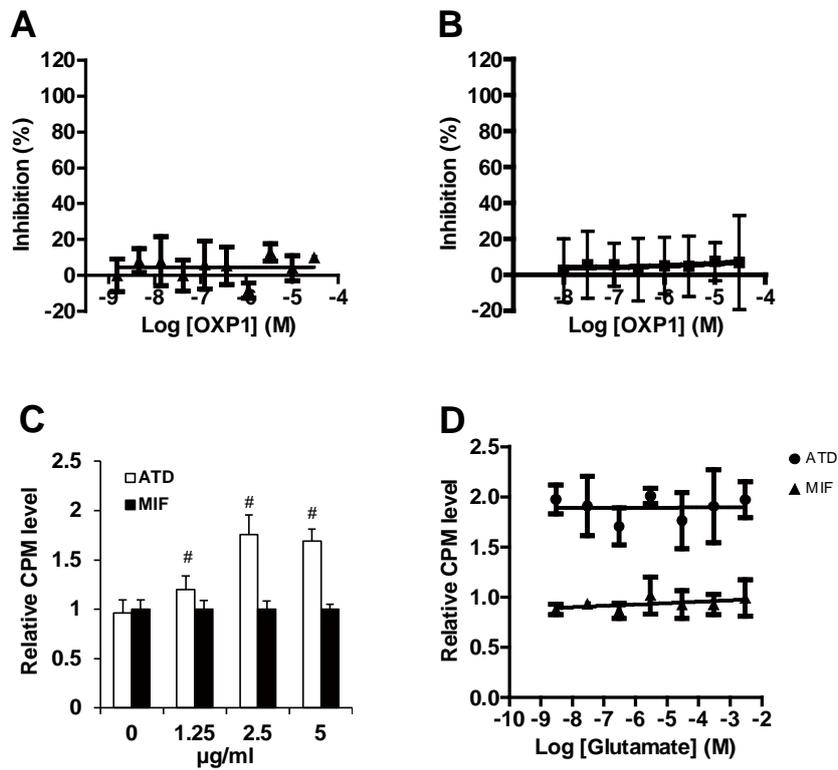


**Figure 9** The mode of HBT1 and LY451395 binding to a pocket in the LBD of AMPA-R differed. (A) Overall structure of GluA2o LBD in complex with HBT1 and LY451395. HBT1 and LY451395 are shown in yellow, glutamate is shown in gray, and the two protomers comprising the dimer are shown in green (protomer A) and cyan (protomer B). Both compounds bind at the dimer interface in two symmetrical orientations. It is noted that only one of the conformations is described, for clarity. (B) Close-up view of the binding site of HBT1 (upper) and LY451395 (lower). The compounds are shown in yellow. The protomers A and B are shown in green and cyan, respectively. The side chains of S518 and S750 exhibit alternative conformations. Hydrogen bonds are shown as orange dashed lines.

### 1. 1. 5 OXP1 は HBT1 と異なるサイトに結合する

OXP1 が [<sup>3</sup>H]-HBT1 の LBD への結合に影響するか 2 つの競合結合試験を用いて検討した。His-LBD を用いた SPA および海馬膜画分を用いた結合アッセイにおいて OXP1 は [<sup>3</sup>H]-HBT1 の His-LBD あるいは海馬膜画分への結合を阻害しなかった (Figure 10A, 10B)。これらの結果は [<sup>3</sup>H]-OXP1 が LBD に結合しなかった結果 (Figure 8B) と一致する。HBT1 と OXP1 が Ca<sup>2+</sup> 流入実験で同等の活性を示したことから (Table 1, Figure 4E, 4F)、OXP1 の結合部位は HBT1 とは異なると考えられる。

AMPA 受容体の ATD は低分子が結合するアロステリックサイトを持っていると考えられているが<sup>28</sup>、これまで ATD に結合するリガンドは報告されていない。そこで、OXP1 と ATD の相互作用を [<sup>3</sup>H]-OXP1 と His-tagged GluA2o ATD タンパク質 (His-ATD) を用いた SPA で調べた。その結果、弱い特異的な His-ATD と [<sup>3</sup>H]-OXP1 の結合が 100 μM glutamate 存在下で認められ、コントロールとして用いた His-MIF への [<sup>3</sup>H]-OXP1 の結合は認められなかった (Figure 10C)。His-ATD と [<sup>3</sup>H]-OXP1 の結合に対するグルタミン酸の影響を調べたところ、グルタミン酸はその結合に影響しなかった (Figure 10D)。さらに、OXP1 が ATD との相互作用を介して AMPA 受容体を活性化しているかを調べるため、アラニンスキャンにより GluA2o の ATD に種々の点変異を導入した。そして、それら変異体を発現する human embryonic kidney (HEK) 293T 細胞を作成し、変異による OXP1 の活性に与える影響を調べた。ATD の点変異により AMPA 受容体全体の立体構造が変化し、AMPA 受容体活性が正常に維持されない可能性が考えられたため、LBD に結合する HBT1 をコントロールとして用いた。その結果、HBT1 の活性が野生型と同程度以上の活性を示す変異体の中で、OXP1 の活性を低下させる変異は認められなかった (Table 2)。OXP1 の活性を低下させる変異は HBT1 の活性も低下させ、今回の実験では 30 以上の GluA2o ATD の変異が HBT1 の活性を 20%以下に低下させた。これらのアミノ酸は AMPA 受容体の活性維持に特に重要な部位であると考えられた。そのため、今回の変異体実験からは ATD と OXP1 の相互作用を示すデータは得られなかったが、それら活性維持に寄与している ATD のアミノ酸残基との相互作用を介して OXP1 が AMPA 受容体を活性化している可能性はまだ残っている。



**Figure 10** Binding site of OXP1 on AMPA-R was different from that of HBT1. (A, B) Effects of OXP1 on [<sup>3</sup>H]-HBT1 binding to His-LBD (A) and rat hippocampal membranes (B). (C) SPA measurement of selective [<sup>3</sup>H]-OXP1 binding to His-tagged GluA2o ATD (His-ATD). His-MIF was used as control protein. (D) Effects of glutamate on the binding of [<sup>3</sup>H]-OXP1 to His-ATD. Concentration-dependent effects of His-ATD (C) were statistically analyzed using the one-tailed Williams' test (<sup>#</sup>P ≤ 0.025; versus control group).

**Table 2** Effects of 30  $\mu$ M HBT1 or 30  $\mu$ M OXP1 in the Ca<sup>2+</sup> influx assay using HEK293T cells expressing GluA2o and GluA2o ATD mutants exposed to 3 mM glutamate. The calcium response induced by 30  $\mu$ M HBT1 or 30  $\mu$ M OXP1 in the GluA2o mutant was normalized to that in the WT GluA2o.

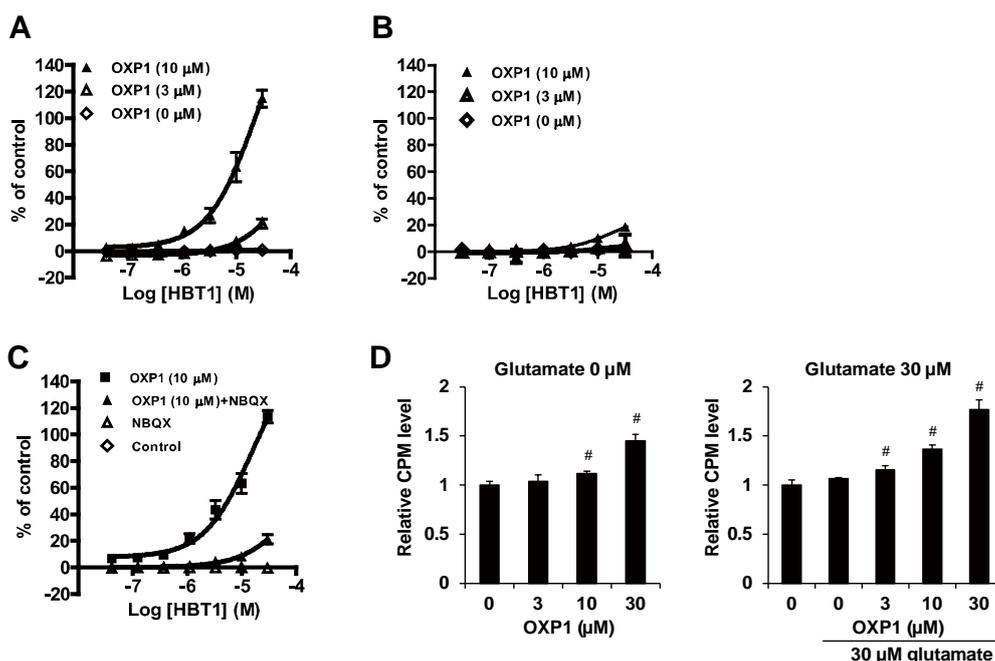
Mutation	Relative response (% 30 $\mu$ M HBT1 in WT GluA2o)	Relative response (% 30 $\mu$ M OXP1 in WT GluA2o)	Mutation	Relative response (% 30 $\mu$ M HBT1 in WT GluA2o)	Relative response (% 30 $\mu$ M OXP1 in WT GluA2o)	Mutation	Relative response (% 30 $\mu$ M HBT1 in WT GluA2o)	Relative response (% 30 $\mu$ M OXP1 in WT GluA2o)	Mutation	Relative response (% 30 $\mu$ M HBT1 in WT GluA2o)	Relative response (% 30 $\mu$ M OXP1 in WT GluA2o)
N184A	386	323	D166A	190	138	Y142A	121	127	N98A	74	51
K283A	359	336	K203A	190	146	N370A	121	123	R315A	73	79
S278A	352	215	V223A	190	168	K272A	116	123	T308A	73	83
N313A	344	285	E212A	183	165	W173A	115	134	R129A	71	64
N185A	319	269	Q352A	181	134	F101A	113	152	R384A	71	85
L195A	312	228	S390A	181	173	V46A	110	133	R206A	70	81
L314A	308	239	L58A	180	164	K394A	108	162	290A	69	86
H108A	307	230	T99A	171	224	S82A	105	112	K215A	69	72
N182A	283	195	D198A	168	153	I369A	104	98	D38A	68	65
L199A	269	231	T225A	168	164	Y371A	98	116	T243A	65	71
K228A	252	248	F103A	163	191	H289A	98	107	I250A	64	53
Q28A	252	171	M395A	159	151	R346A	98	112	I226A	63	57
V49A	242	229	L107A	157	111	F116A	95	129	R323A	63	100
H234A	242	169	E66A	157	214	L240A	94	116	D63A	62	66
K385A	233	225	E377A	152	163	I219A	93	76	E354A	62	68
S138A	233	197	E401A	150	166	S115A	93	118	R193A	62	45
L269A	229	184	D265A	150	136	K172A	86	101	L402A	62	136
K187A	229	227	F252A	146	110	C211A	86	95	L132A	61	45
Q80A	226	251	Q261A	145	161	K95A	83	73	106A	61	62
L158A	224	279	R83A	145	184	D393A	83	94	V97A	60	62
Y41A	223	252	N179A	143	184	E275A	83	122	E204A	60	57
F81A	218	164	E141A	140	153	E345A	83	122	D186A	59	65
S79A	216	164	L399A	138	172	M376A	82	107	N64A	59	75
K361A	214	153	K316A	137	189	V73A	82	95	Y86A	59	75
Q222A	209	266	L247A	137	143	Y388A	81	95	I321A	59	76
N374A	208	145	D244A	137	101	291A	79	66	D329A	59	77
K367A	204	222	L137A	136	111	H122A	77	54	E170A	58	68
Y295A	201	172	K294A	135	156	Y92A	77	85	F196A	58	68
F51A	197	201	V392A	133	177	K94A	76	67	D153A	58	38
I183A	193	190	I262A	127	156	E309A	75	81	N256A	57	54

Mutation	Relative response (% 30 $\mu$ M HBT1 in WT GluA2o)	Relative response (% 30 $\mu$ M OXP1 in WT GluA2o)	Mutation	Relative response (% 30 $\mu$ M HBT1 in WT GluA2o)	Relative response (% 30 $\mu$ M OXP1 in WT GluA2o)	Mutation	Relative response (% 30 $\mu$ M HBT1 in WT GluA2o)	Relative response (% 30 $\mu$ M OXP1 in WT GluA2o)	Mutation	Relative response (% 30 $\mu$ M HBT1 in WT GluA2o)	Relative response (% 30 $\mu$ M OXP1 in WT GluA2o)
V270A	56	63	Q305A	43	59	L248A	34	46	M48A	28	53
V121A	55	51	D93A	43	70	E190A	34	37	E320A	27	43
C104A	54	68	V336A	42	47	Q39A	33	38	L136A	27	20
E343A	54	60	M191A	42	50	F56A	33	47	S268A	27	42
N217A	54	52	D131A	42	40	D160A	33	41	K249A	27	55
K133A	53	67	F91A	41	14	S271A	33	46	V180A	27	33
372A	52	80	Q350A	41	59	I344A	33	49	D264A	27	36
W145A	52	30	K231A	40	37	Q144A	33	64	S322A	26	49
H61A	52	77	S42A	40	44	L151A	33	34	Q340A	26	50
L201A	52	54	V230A	40	63	D155A	32	37	D267A	26	42
I224A	52	68	Y265A	40	59	I178A	32	31	I62A	26	32
R213A	52	42	T398A	40	84	I293A	32	17	V85A	25	34
59A	51	75	R45A	39	51	Q317A	32	48	279A	25	36
K202A	50	61	N381A	39	54	Q50A	32	35	Q197A	25	56
292A	49	54	K188A	39	51	F273A	31	13	Y233A	25	30
S102A	49	65	V164A	38	39	F311A	31	44	S167A	25	28
T176A	48	48	D221A	38	61	D218A	31	50	E284A	24	42
L280A	48	54	S258A	37	50	E55A	31	41	T74A	24	33
S194A	48	52	I386A	37	48	D210A	30	39	V397A	24	69
I360A	48	23	K379A	37	44	T296A	30	44	V175A	24	24
L161A	48	41	Y192A	36	40	I373A	30	26	N75A	24	42
T400A	47	100	L356A	36	22	T380A	30	46	V67A	24	24
N333A	46	48	D146A	35	31	N239A	29	33	D189A	23	30
D119A	45	37	V342A	35	44	V396A	29	78	D246A	23	28
L165A	45	51	L65A	35	30	R156A	29	31	N359A	23	48
D214A	44	58	H229A	35	32	E200A	29	55	N25A	23	33
K147A	44	42	V351A	35	42	S110A	28	43	T53A	22	39
F124A	43	39	W338A	35	36	R276A	28	37	E281A	21	37
S154A	43	28	Q162A	34	55	R312A	28	48	K118A	19	12
S159A	43	41	Y143A	34	17	C78A	28	16	S26A	19	34

Mutation	Relative response (% 30 $\mu$ M HBT1 in WT GluA2o)	Relative response (% 30 $\mu$ M OXP1 in WT GluA2o)	Mutation	Relative response (% 30 $\mu$ M HBT1 in WT GluA2o)	Relative response (% 30 $\mu$ M OXP1 in WT GluA2o)
E40A	19	5	W389A	1	3
R35A	18	18	F77A	1	6
Y152A	17	22	S357A	1	11
E391A	17	35	F33A	1	1
S54A	17	28	V263A	0	1
S52A	17	38	Y301A	0	1
E282A	17	32			
I27A	16	31			
L378A	16	32			
R205A	15	30			
C330A	15	11			
V353A	14	22			
W277A	14	22			
Q251A	14	33			
R318A	14	28			
I100A	13	23			
I274A	13	23			
Q174A	11	10			
K349A	9	20			
L209A	8	9			
F242A	8	19			
V257A	8	21			
V109A	7	18			
Y285A	7	17			
S96A	4	11			
L32A	3	7			
F71A	3	24			
R368A	2	2			
L348A	2	3			
F44A	1	2			

### 1. 1. 6 OXP1 は AMPA 非存在下で HBT1 と AMPA 受容体の結合を促進し、AMPA 受容体を活性化する

ファンクショナルアッセイで見出された AMPA 受容体 PAM は HBT1 結合部位や OXP1 結合部位など複数の結合部位に親和性を持つ可能性がある。そのため、HBT1 結合部位と OXP1 結合部位の共活性化による AMPA 受容体への影響を調べた。Figure 4E および 4F で示したように、AMPA 非存在下では HBT1 と OXP1 はそれぞれ 30 および 10  $\mu$ M まで初代神経細胞で  $Ca^{2+}$  流入を誘導しない。しかし、興味深いことに、30  $\mu$ M HBT1 と 3 あるいは 10  $\mu$ M OXP1 を共添加すると AMPA 非存在下においても  $Ca^{2+}$  流入を誘導した (Figure 11A)。しかし、それらの現象は GluA1i CHO 細胞では観察されなかった (Figure 11B)。また、この HBT1 と OXP1 の共添加による  $Ca^{2+}$  流入は NBQX により阻害された (Figure 11C)。これらのことから、HBT1 と OXP1 の共刺激は AMPA 非存在下の初代神経細胞において AMPA 受容体を活性化することが示唆された。OXP1 は HBT1 と異なりグルタミン酸非存在下においても AMPA 受容体に結合する (Figure 10D)。そのため、OXP1 が HBT1 の AMPA 受容体への結合を促進するか [ $^3H$ ]-HBT1 と海馬膜画分を用いて検討した。HBT1 と OXP1 の共刺激による AMPA 受容体の活性化に初代神経細胞から遊離される低濃度の内因性グルタミン酸が影響している可能性を考慮して、実験はグルタミン酸非存在下と低濃度のグルタミン酸存在下の 2 つの条件で実施した。OXP1 は両条件において濃度依存的に [ $^3H$ ]-HBT1 の海馬膜画分への結合を促進した (Figure 11D)。このことから OXP1 はアゴニスト非存在下あるいは低濃度アゴニスト存在下において HBT1 の AMPA 受容体への結合を促進することが示唆された。



**Figure 11** OXP1 promoted binding between HBT1 and AMPA-R and activated AMPA-R in the absence of agonist. (A, B) Effects of co-application of HBT1 and OXP1 on  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the absence of agonist in primary neurons (A) or GluA1i CHO cells (B). (C) Effects of 10  $\mu\text{M}$  NBQX on the induction of  $\text{Ca}^{2+}$  influx by co-application of HBT1 and 10  $\mu\text{M}$  OXP1 in the absence of AMPA. (D) Effects of OXP1 on the binding of [ $^3\text{H}$ ]-HBT1 to hippocampal membranes in the absence of glutamate or at 30  $\mu\text{M}$  glutamate. Data are presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 3-4$ . Concentration-dependent effects of test compounds (D) were statistically analyzed using the one-tailed Williams' test ( $\#P \leq 0.025$ ; versus control group).

## 第2節 考察

AMPA 受容体 PAM である LY451646 と LY451395 は *in vivo* BDNF 産生を含む種々の薬理作用においてベルシェイプ型反応性を示すリスクを持っている<sup>20-23, 29</sup>。私は LY451646 と LY451395 が初代神経細胞においても BDNF 産生促進作用がベルシェイプになることを見出した (Figure 2B)。*in vitro* BDNF アッセイと *in vivo* BDNF アッセイの間のベルシェイプ型反応性の関係をさらに調べる必要があるが、*in vitro* BDNF アッセイは AMPA 受容体 PAM のベルシェイプのリスクを評価するために有用であると考えられる。

LY451395 は GluA1i を発現する細胞株では活性を示さなかったが、初代神経細胞においてアゴニスト非存在下で AMPA 受容体を活性化した (Figure 3A, 3B)。従って、LY451395 は生理的な AMPA 受容体に対してアゴニスト作用を示すと考えられる。これらの結果は既存の報告と一致しており、LY451646 を含むラセミ体化合物 LY404187 は初代神経細胞を用いたパッチクランプアッセイにおいて AMPA 非存在下で活性を示すが、AMPA 受容体を発現する細胞株ではアゴニスト活性を示さないと報告されている<sup>30, 31</sup>。初代神経細胞から放出される非常に低濃度のグルタミン酸が LY451395 のアゴニスト作用に関与している可能性はある。しかし、例えそうであったとしても、LY451395 はグルタミン酸に対して感受性が高く、脳内では結果的にアゴニストとほぼ同じ作用を示すと考えられる。LY451395 はパッチクランプアッセ

イやCa<sup>2+</sup>流入試験においてアゴニスト作用を示す濃度 (0.3 μM) から BDNF アッセイでベルシェイプ型反応性を示した (Figure 2B)。このことから、アゴニスト活性が化合物のベルシェイプ型反応性に関係していると推察される。

HBT1 と OXP1 の結合部位の解析から HBT1 は OXP1 と異なり GluA2o LBD に結合することが明らかとなった (Figure 8C, 8F)。また、X線構造結晶解析から HBT1 は LY451395 とは異なり S518 と水素結合を形成することが分かった。このことから、HBT1 が相互作用する LBD のアミノ酸残基は LY451395 とは異なるので、この違いが HBT1 の低アゴニスト性と関連しているのではないかと考えられた。LBD にある HBT1 結合部位はグルタミン酸の結合によって変化する<sup>32,33</sup>。 [<sup>3</sup>H]-HBT1 はグルタミン酸存在下でのみ His-LBD や海馬膜画分に結合する。一方、 [<sup>3</sup>H]-LY395153 (LY451395 と類似の構造を有する化合物) はアゴニスト非存在下でも脳膜画分に結合することが報告されている<sup>34</sup>。これらの結果は、LY451395 がアゴニスト非存在下で AMPA 受容体に結合していることを示唆している。

[<sup>3</sup>H]-OXP1 は SPA の実験から His-ATD に特異的に結合した (Figure 10C)。このことは、AMPA 受容体の ATD は低分子が結合するポケットを有しており、脳内に AMPA 受容体の ATD リガンドが存在することを示しているのかもしれない。しかし、 [<sup>3</sup>H]-OXP1 の His-ATD への結合は弱く、また、ポジティブコントロールとして既存の ATD リガンドがないため、今回用いた His-ATD タンパク質の構造が生理的な受容体の構造と類似しているかは不明である。従って、OXP1 が ATD に本当に結合しているかさらなる検証が必要である。また、OXP1 のアゴニスト作用は OXP1 結合部位に結合する化合物の共通の特徴であるか不明であるので、この部位に結合する化合物の更なる検証も必要である。

初代神経細胞で認められたアゴニスト非存在下での LY451395、OXP1、HBT1+OXP1 による AMPA 受容体の活性化は GluA1i CHO 細胞では認められなかった (Figure 3C, 4C, 11B)。そのため低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM を探索するためには、AMPA 受容体発現細胞株を用いたファンクショナルアッセイに依存したスクリーニングだけでは不十分であり、それぞれの化合物の結合部位を理解することが重要である。生体内の AMPA 受容体は他の補助サブユニットと複合体を形成しており、その構造は非常に複雑である。従って、それらを完全に再構成するのは困難であり、組み換え AMPA 受容体の特性とネイティブ AMPA 受容体の特性は大きく異なると考えられる。実際、AMPA 受容体を発現させた細胞株を用いた Ca<sup>2+</sup>流入アッセイではグルタミン酸による AMPA 受容体の活性化が検出できない<sup>31</sup>。そのため、初代神経細胞を用いたファンクショナルアッセイは低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM を探索するために有効であることがわかった。

### 第3節 小括

本章では、AMPA 受容体 PAM のアゴニスト作用がベルシェイプ型反応性に関与する知見を得た。そして、低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM である HBT1 は *in vitro* BDNF アッセイにおいて LY451646、LY451395、OXP1 よりもベルシェイプ型反応性のリスクが低いことを見出

した。残念ながら HBT1 は ADME プロファイルがよくなかったため、*in vivo* 試験によるさらなる検証はできなかった (data not shown)。しかしながら、低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM を探索するためには、本章で用いた種々の結合試験やファンクショナルアッセイを用いたスクリーニングアプローチが有効であることがわかった。

## 第4節 実験方法

### 試薬

2-(((5-methyl-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl)acetyl)amino)-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-3-carboxamide (HBT1)、(3S)-1-(4-tert-butylphenyl)-N-((1R)-2-(dimethylamino)-1-phenylethyl)-3-isobutyl-2-oxopyrrolidine-3-carboxamide (OXP1)、LY451395、LY451646 は武田薬品工業 (株) で合成した。 $[^3\text{H}]$ -HBT1 および $[^3\text{H}]$ -OXP1 は積水メディカル (株) で合成した。S-AMPA は Enzo Life Sciences、NBQX は Wako あるいは Tocris、Cyclothiazide (CTZ) は Tocris からそれぞれ購入した。その他の試薬については標準的な市販品を用いた。

### 動物

Sprague-Dawley (SD) ラットは Charles River Laboratories Japan から購入した。動物は明暗サイクルがコントロールされた飼育室で飼育し (12-h light/dark cycle, 7:00 pm に消灯)、実験前に1週間以上の馴化飼育を行った。動物の飼育および使用、実験プロトコルは武田薬品動物実験委員会の承認を得た。

### ラット初代神経細胞の調製

ラット初代海馬神経細胞は胎生 19 日の SD ラットの胎児から調製した。ラット胎児から脳を摘出し、氷冷した Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS) 内で海馬を取り出した。そして、海馬を Neural cell dispersion kit (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) を用いて細胞に分散した。それら細胞を B27 supplement (Thermo Fisher Scientific Inc.)、2 mM L-glutamine (Lonza)、100 U/mL penicillin (Lonza)、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin (Lonza)、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicin sulfate (Lonza) を含む Neurobasal medium で懸濁した。細胞は Poly-D-lysine coated 96-well plates (Corning Incorporated) あるいは Poly-L-lysine coated 96-well plates (Sumitomo Bakelite) に  $5 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し、5%  $\text{CO}_2$ 、37° C で培養した。

### 初代神経細胞を用いた BDNF アッセイ

初代海馬神経細胞培養 5 日後に BDNF アッセイを行った。初代海馬神経細胞に化合物を AMPA (1  $\mu\text{M}$ ) 存在下あるいは非存在下の条件で 24 時間処置した。細胞を Phosphate buffered saline で一度洗浄し、60  $\mu\text{L}$  の溶解バッファー (20 mM Tris-HCl at pH 8.0、137 mM NaCl、

10% glycerol、1% NP-40、1% protease inhibitor cocktail [Sigma-Aldrich])で回収した。BDNFの濃度はBDNF Emax ImmunoAssay System (Promega)で測定した。

### 初代神経細胞を用いた Lactate dehydrogenase (LDH) release アッセイ

初代海馬神経細胞培養 5 日後に LDH release アッセイを行った。初代海馬神経細胞に化合物を AMPA (1  $\mu$ M) 存在下あるいは非存在下の条件で 24 時間処置した。LDH の培地中の濃度は LDH cytotoxicity detection kit (Takara Bio Inc)で測定した。

### 初代神経細胞を用いたパッチクランプアッセイ

初代海馬神経細胞培養 11-20 日後にホールセルパッチクランプアッセイを行った。パッチ電極 (チップの抵抗は 3 から 5 M $\Omega$ ) には細胞内溶液 (CsCl 135.0 mM、MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM、HEPES 10.0 mM、EGTA 10.0 mM、Mg-ATP 4.0 mM、Na<sub>2</sub>-GTP 0.3 mM、CsOH (浸透圧 275-295 mosm/L) で pH7.3 に調製) を充填した。細胞外溶液には NaCl 140.0 mM、KCl 4.0 mM、CaCl<sub>2</sub> 2.0 mM、MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM、HEPES 10.0 mM、NaHCO<sub>3</sub> 5.0 mM、D(+)-glucose 10.0 mM、TTX 0.001 mM、D-AP5 0.05 mM (NaOH (浸透圧 300-315 mosm/L) で pH7.4 に調製) を用いた。すべての実験は室温で行い、測定には Axopatch 1B 増幅器と pCLAMP 9 ソフトウェアあるいは MultiClamp 700B 増幅器と pCLAMP 10 ソフトウェア (Molecular Devices, LLC) を用い、ローパスフィルター (2 kHz) をかけて、オフライン解析用にハードディスクドライブに保存した。神経細胞は -80 mV に固定して電流を記録した。Y-tube 薬液添加系を用いてアゴニストと化合物の添加によって定常状態内向き電流を誘導した。AMPA 非存在下では化合物を 60 秒間添加し、AMPA 存在下では AMPA 添加前に化合物を 20 秒間添加し、その後 AMPA を 10 秒間共添加した。データは Clampfit 9 あるいは Clampfit 10 ソフトウェア (Molecular Devices) で解析した。電流の大きさは、最大電流に対する割合あるいはアゴニストのコントロール電流に対する割合として表示した。

### 初代神経細胞を用いた Ca<sup>2+</sup>流入アッセイ

初代海馬神経細胞培養 5 日後に Ca<sup>2+</sup>流入アッセイを行った。培養液を除いた後、Fluorescent calcium indicator dye solution (Calcium4 assay Kit, Dojindo) と 1.25 mM Probenecid (Dojindo) を含む Ca<sup>2+</sup> reaction buffer (DMEM、10 mM HEPES、0.05% BSA) 75  $\mu$ L を細胞に添加し、5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$  C で 60 分間インキュベートした。75  $\mu$ L の Fluorescent calcium indicator dye solution で細胞を一度洗浄し、再び 75  $\mu$ L の Fluorescent calcium indicator dye solution を添加した後、化合物による細胞内 Ca<sup>2+</sup>レベルの相対的増加量を蛍光イメージングプレートリーダーで 8.5 分間測定した。化合物の活性は測定した蛍光強度の積算値で算出した。0% は DMSO 添加時の活性で定義し、100% は 5  $\mu$ M AMPA と 10  $\mu$ M HBT1 を添加した際の活性で定義した。EC<sub>50</sub> 値はロジスティック回帰分析で算出した。

## 発現細胞株の作製

ヒト AMPA 受容体 (GluA1-4i、GluA1-4o)、ヒト TARPs  $\gamma 2$  cDNA、カイニン酸受容体 (GluK1、GluK2) は pcDNA3.1(+)あるいは pcDNA3.1(-) Zeo mammalian expression vectors (Thermo Fisher Scientific Inc.) にクローニングした。Chinese hamster ovary (CHO) 細胞にそれぞれの AMPA 受容体ベクターと TARPs  $\gamma 2$  ベクターを同時に Gene Pulser II Electroporation System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて導入した。カイニン酸受容体は GluK1 あるいは GluK2 ベクターを CHO 細胞に単独で導入した。G-418 Sulfate (Wako) 耐性クローンを取得し、最終的にその内の 1 クローンを  $\text{Ca}^{2+}$  流入アッセイにより選択した。

## AMPA 受容体およびカイニン酸受容体発現細胞を用いた $\text{Ca}^{2+}$ 流入アッセイ

ヒト AMPA 受容体 (GluA1-4、GluA1-4o) とヒト TARPs  $\gamma 2$  を共発現させた CHO 細胞あるいはカイニン酸受容体 (GluK1、GluK2) を発現させた CHO 細胞を  $3 \times 10^4$  cells/well で 96-well Black Clear plate (Corning Incorporated) に播種し、5%  $\text{CO}_2$ 、37° C の条件で 24 時間培養した。培養培地を除いた後、100  $\mu\text{L}$  の Fluorescent calcium indicator dye solution (Calcium5 assay Kit, Molecular Devices, Inc.) と 1.25 mM Probenecid (Thermo Fisher Scientific Inc.) を含む  $\text{Ca}^{2+}$  reaction buffer (Hanks' Balanced Salt Solutions、10 mM HEPES、0.1% BSA) を添加し、5%  $\text{CO}_2$ 、37° C で 1 時間インキュベートした。細胞を 100  $\mu\text{L}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  reaction buffer で洗浄した後、100  $\mu\text{L}$  の Fluorescent calcium indicator dye solution を添加した。この洗浄ステップはサブユニット選択性あるいはスプライシングバリエーション選択性試験では省略した。3 mM のグルタミン酸存在下、非存在下での化合物による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルの増加量を Fluorometric imaging plate reader (CellLux, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc.) で 3 分間測定した。カイニン酸受容体のアッセイでは、Fluorescent calcium indicator dye solution に化合物と Dimethyl sulfoxide (DMSO) あるいは 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Concanavalin A を添加し、実験に用いた。60 分間のインキュベーション後、グルタミン酸存在下での化合物による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルの増加量を Fluorometric imaging plate reader で 3 分間測定した。化合物の活性は蛍光強度の積算値を用いて算出した。3 mM グルタミン酸を用いた AMPA 受容体のアッセイでは 3 mM グルタミン酸と DMSO を添加した際の活性を 0% とし、3 mM グルタミン酸と 300  $\mu\text{M}$  CTZ あるいは 3 mM グルタミン酸と 10  $\mu\text{M}$  LY451646 を添加した際の活性を 100% とした。グルタミン酸を用いない AMPA 受容体のアッセイでは DMSO を添加した際の活性を 0% とし、3 mM グルタミン酸と 300  $\mu\text{M}$  CTZ あるいは 3 mM グルタミン酸と 10  $\mu\text{M}$  LY451646 を添加した際の活性を 100% とした。カイニン酸アッセイでは 3 mM グルタミン酸と DMSO を添加した際の活性を 0% とし、3 mM グルタミン酸と Concanavalin A を添加した際の活性を 100% とした。EC<sub>50</sub> 値はロジスティック回帰分析で算出した。

### 組み換えタンパク質用の発現ベクターの構築

GluA2o LBD は GluA2o subunit の N413-K527 と P653-S796 のアミノ酸からなる部分タンパク質で、GT linker により Lys527 と Pro653 の部分が繋がれている。クローニングには GluA2o cDNA を PCR テンプレートとして用いた。primer 1 (GCATATGCATCACCATCACCATCACACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCCAATAAGACTGTTGTTGTCACCACA) と primer 2 (AAGATCCTCAGCACTTTCGATGGGGTACCCCTTCTTGATCATGATAGATATCCC) を用いて Gene fragment S1 を作製し、primer 3 (GGGATATCTATCATGATCAAGAAGGGTACCCCATCGAAAGTGCTGAGGATCTT) と primer 4 (CGCGGCCGCTCAGCTGCCGCACTCTCCTTT) を用いて Gene fragment S2 を作製した。Gene fragment S1 と S2 をそれぞれ pCR TOPO II vector にサブクローニングし、その後 2 つのフラグメントを pRH8 vector にクローニングした。GluA2o ATD 遺伝子は hGluA2o (22-404)-His / pcDNA3.3 vector から取得した。hGluA2o (22-404)-His 遺伝子は GluA2o cDNA をテンプレートとして PCR により作製した。primer 1 (GATGGGTGCGTAGCTGAAGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGTGTCTTCTTAACAGCATAACAG) と primer 2 (ATAATAGCTAGCTTGAAGTATAAATTCTCAGAAGGGAGCTCAGTAAGGGTAAC) を PCR プライマーとして用い、PCR 産物を pSeqTag2 vector (Thermo Fisher Scientific Inc.) にクローニングした。

### 組み換えタンパク質の発現と精製

pRH8-GluA2-LBD プラスミドを *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) 細胞にトランスフェクションし、カナマイシンを添加した LB 培地を用いて 37° C で培養した。細胞を 0.6 から 0.8 (A600) まで増殖させた後に、IPTG 誘導 (終濃度 0.5 mM) を行った。細胞を 16° C、20 時間培養した後、細胞を回収し、Ni-NTA カラム (Qiagen) と 500 mM imidazole、50 mM Tris-HCl、150 mM sodium chloride、0.5 mM dithiothreitol を含む溶液 (pH 8.0) で GluA2-LBD を精製した。SPA 用には、タンパク質を Superdex 200 column (GE Healthcare UK Ltd) と 20 mM HEPES、50 mM sodium chloride、1 mM glutamate を含む溶液 (pH 7.0) でさらに精製した。共結晶解析用には、GluA2-LBD から TEV-protease cleavage と Ni-affinity クロマトグラフィによって N 末の 6×His tag を除き、Superdex 200 column で精製を行った。すべての精製段階において Glutamate (1 mM) を溶液中に添加した。タンパク質は 20 mM HEPES、50 mM sodium chloride、1 mM glutamate を含む溶液 (pH 7.0) に 10-15 mg/mL 濃度で保存した。pSeqTag2-GluA2-ATD プラスミドは Freestyle 293 cells (Thermo Fisher Scientific Inc.) にトランスフェクションし、37° C で 3 日間 FreeStyle 293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific Inc.) で培養した。培養溶液に分泌された GluA2o ATD タンパク質を回収し、500 mM imidazole、50 mM Tris-HCl、150 mM sodium chloride、0.5 mM dithiothreitol を含む溶液 (pH 8.0) と Ni-NTA agarose column (Qiagen) で精製した。その後、精製したタンパク質を AcTEV (Thermo Fisher Scientific Inc.) で消化し、Superdex 200 (GE Healthcare UK Ltd.) を用いてサイズ排除クロマトグラフィを行った。タンパク質は 20 mM

Tris、150 mM NaCl、1 mM DTT を含む溶液 (pH 7.5) に 1-2 mg/mL の濃度で保存した。

#### Scintillation proximity assay (SPA)

62.5  $\mu$ g の YSi (2-5  $\mu$ m) copper his-tag SPA beads (PerkinElmer Inc.) と 0.25  $\mu$ g の His-LBD を含む 100  $\mu$ L アッセイバッファー (0.01% NP-40 を含む PBS) を 96 well LumiNunc plates (Thermo Fisher Scientific Inc.) に添加し、4° C、オーバーナイトでインキュベートした。その後、化合物とトリチウムラベル化リガンド (40 nM [<sup>3</sup>H]-HBT1 あるいは 100 nM [<sup>3</sup>H]-OXP1) をそれぞれのウェルに添加した。His-ATD を用いた SPA では、62.5  $\mu$ g の YSi (2-5  $\mu$ m) copper his-tag SPA beads と 0.25  $\mu$ g の His-ATD を含む 100  $\mu$ L アッセイバッファー (0.01% NP-40 を含む PBS) を 96 well LumiNunc plates (Thermo Fisher Scientific Inc.) に添加し、室温、1 時間インキュベートした。その後、100 nM [<sup>3</sup>H]-OXP1 をそれぞれのウェルに添加した。特異的結合は全結合から非特異的結合を除いたものと定義した。コントロールタンパク質 (MIF タンパク質) の SPA beads への結合を非特異的結合とした。実験は特に記載がない限り、100  $\mu$ M グルタミン酸存在下で行った。結合反応は室温で 3-5 時間行い、ラベル体の結合による放射活性は microplate scintillation counter (TopCount NXT, PerkinElmer Inc.) で測定した。すべての化合物は DMSO (終濃度 3%) に溶解した。IC<sub>50</sub> 値はロジスティック回帰分析で算出した。

#### 海馬膜画分を用いた結合アッセイ

6-8 週齢の雄のラットから海馬を摘出し、ドライアイスで海馬を凍結した。凍結した組織は実験に用いるまで -80° C で保存した。凍結した組織を 3.4 倍量の氷冷した Assay buffer (30 mM Tris-HCl at pH 7.4) に入れ、Polytron で 30 秒間ホモジネートした。その懸濁液を 20,000g、20 分 (4° C) で遠心し、ペレットを同量の氷冷した Assay buffer で再懸濁した。その後、氷冷した Assay buffer で再度洗浄した。膜画分を再懸濁した後、1.2 mg の膜タンパク質、90 nM [<sup>3</sup>H]-HBT1、化合物、0.025% NP-40、assay buffer (最終用量 1.0 mL) の混合液を調製した。非特異的結合は 10  $\mu$ M LY451646 を添加した際の値を用いた。アッセイは 3 mM グルタミン酸存在下で行った。混合液を 37° C、2 時間インキュベートし、0.03% polyethylenimine にプレソークした GF/B filters (GE Healthcare UK Ltd.) に通し、20 mL の氷冷した Assay buffer で洗浄した。 [<sup>3</sup>H]-AMPA を用いた結合アッセイでは、0.3 mg の膜タンパク質、4 nM [<sup>3</sup>H]-AMPA、化合物、50 mM KSCN、0.01% NP-40、assay buffer (最終用量 1.0 mL) の混合液を調製した。非特異的結合は 100  $\mu$ M AMPA を添加した際の値を用いた。混合液を氷上で 1 時間インキュベートし、0.03% polyethylenimine にプレソークした GF/B filters に通し、20 mL の氷冷した Assay buffer で洗浄した。フィルター上に残った放射活性は液体シンチレーションカウンター (LSC-6100, ALOKA) で測定した。タンパク質量は bicinchoninic acid assay method (Thermo Fisher Scientific Inc.) で測定した。すべての化合物は DMSO (終濃度 0.3% 以下) に溶解した。IC<sub>50</sub> 値はロジスティック回帰分析

で算出した。

**Table 3** Crystallographic data collection and refinement statistics.

Crystal	GluR2o LBD/HBT1	GluR2o LBD/LY451395
<b>Data collection</b>		
Space group	$P2_1$	$P2_1$
Unit cell dimensions		
a, b, c (Å)	113.6, 162.1, 47.1	113.7, 161.9, 47.0
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 90.0, 90	90, 90.0, 90
Resolution (Å)	50–1.50 (1.53–1.50)	50–1.52 (1.56–1.52)
Observed reflections	973592	1048198
Unique reflections	269829 (17864)	258897 (16564)
Redundancy	3.6 (2.9)	4.0 (3.0)
Completeness (%)	99.5 (98.7)	99.6 (96.4)
$I/\sigma$	18.2 (2.2)	20.4 (1.9)
$R_{\text{sym}}^a$	0.058 (0.514)	0.057 (0.546)
Molecules in ASU	6	6
<b>Refinement</b>		
Resolution (Å)	40–1.50 (1.54–1.50)	40–1.52 (1.56–1.52)
Reflections	256042 (18559)	245610 (17446)
$R_{\text{work}}^b$	0.185 (0.271)	0.202 (0.297)
$R_{\text{free}}^b$	0.208 (0.286)	0.233 (0.311)
<b>Number of atoms</b>		
Protein	12279	12345
Ligand/ion	234	276
Water	1653	1242
<b>B factor (Å<sup>2</sup>)<sup>c</sup></b>		
Protein	14.6	21.1
Ligand/ion	13.6	26.8
Water	32.8	26.4
<b>R.m.s. deviation from ideal geometry</b>		
Bond lengths (Å)	0.009	0.010
Bond angles (°)	1.41	1.45
<b>Ramachandran plot (%)<sup>d</sup></b>		
Preferred regions	98.8	97.9
Allowed regions	1.0	1.8
Disallowed regions	0.2	0.3
PDB code	5YBF	5YBG

<sup>a</sup>  $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i \langle I(h) \rangle$ , where  $\langle I(h) \rangle$  is the mean intensity of symmetry-related reflections.

<sup>b</sup>  $R_{\text{work}} = \sum |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| / \sum |F_{\text{obs}}|$ .  $R_{\text{free}}$  was calculated for randomly chosen 5% of reflections excluded from refinement. <sup>c</sup> B-factor includes contributions from TLS parameters. <sup>d</sup> Calculated with Coot. Values in parentheses are those for the highest resolution shell.

### GluA2o LBD/HBT1 複合体および GluA2o LBD/LY451395 複合体の X線結晶構造解析

結晶化の前に、化合物の終濃度が 1.5 mM となるように化合物をタンパク質溶液に添加し、16° C で数時間静置した。結晶はタンパク質溶液とリザーバー溶液 (11–18% PEG 3350、0.1 M sodium acetate、0.1 M zinc acetate (pH 4.3–5.4)) の混合比 1:1 でシッティングドロップ蒸気核酸法を用いて 4° C で作製した。データ収集の前に、結晶は 30% glycerol を含む母液に浸し、液体窒素で急速凍結した。回折データは Quantum210 CCD detector (ADSC) を用いた Advance Light Source Beam Line 5.0.3 で単一結晶から取得した。回折データは HKL2000<sup>35</sup> を用いて処理した。結晶構造は、グルタミン酸結合型 GluA2-LBD (PDB code 1FTJ) を初期モデルとして、CCP4 ソフトウェアパッケージのプログラム MOLREP を用いて、分子置

換法で決定した。結晶構造は REFMAC<sup>36</sup> と COOT<sup>37</sup> を用いて精密化した。リガンドのパラメーターファイルは AFITT (OpenEye Scientific Software) で作成し、最終モデルは Molprobity<sup>38</sup> で検証した。回折データ処理と結晶構造の精密化の統計値は上記のテーブル (Table 3) に示した。すべての結晶構造の図は PyMOL (Schrödinger, LLC) によって作成した。

### 統計解析

2 グループの統計的有意差は Aspin-Welch's *t*-test あるいは Student's *t*-test を用いて解析し、P 値  $\leq 0.05$  を有意な差とした。化合物の複数濃度の作用を評価する試験においては、統計的有意差は one-tailed Williams' test あるいは one-tailed Shirley-Williams test を用いて解析し、P 値  $\leq 0.025$  を有意な差とした。AMPA を用いた BDNF アッセイにおいては、コントロールと LY451646、LY451395 あるいは OXP1 の統計的有意差は Dunnett's test で解析し、P 値  $\leq 0.05$  を有意な差とした。

## 第2章 AMPA受容体のS743との立体障害によるAMPA受容体PAMのアゴニスト作用の軽減

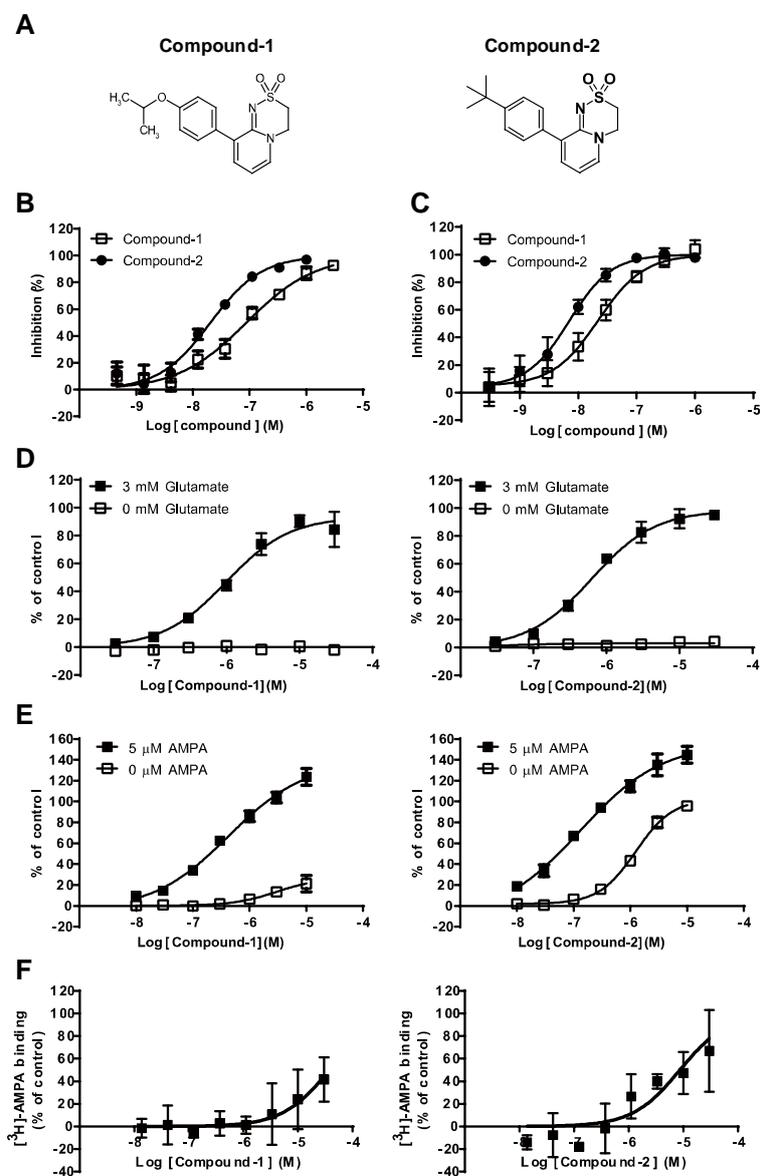
### 緒言

第1章では3つのAMPA受容体PAMの特徴づけを行い、HBT1は他のAMPA受容体PAMよりもアゴニスト作用が低く、広い濃度域でBDNF産生促進作用を有していることがわかった。HBT1はOXP1とは異なる部位に結合し、LY451395とは結合部位（AMPA受容体のLBD）は同じであるが結合様式が異なることが示唆された。これらの結果から低アゴニスト性AMPA受容体PAMの探索には、AMPA受容体のHBT1結合部位に結合する化合物の結合様式とその機能的表現系の関係を考慮した化合物の最適化が重要であると考えられる。本章では、これらの知見を基に、より薬効および安全性面で優れたAMPA受容体PAMの創成について研究を行った。

### 第1節 結果

#### 2.1.1 Compound-1は初代神経細胞においてCompound-2よりもアゴニスト作用が低い

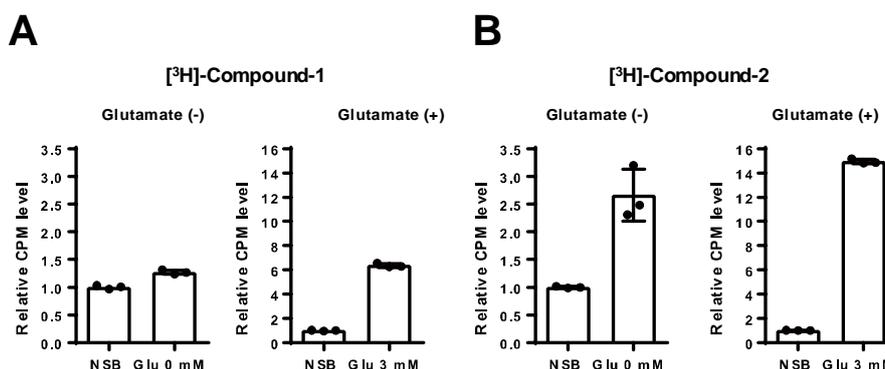
アゴニスト作用の低いAMPA受容体PAMを探索するため、 $[^3\text{H}]$ -HBT1とHis-LBDを用いたSPAによって化合物スクリーニングを行った。その結果、新規ケモタイプ（dihydropyridothiadiazine 2,2-dioxides）を見出した。Dihydropyridothiadiazine 2,2-dioxides誘導体であるCompound-1とCompound-2（Figure 12A）は $[^3\text{H}]$ -HBT1とLBDの結合を阻害し、その $K_i$ 値はそれぞれ0.082と0.019  $\mu\text{M}$ であった（Figure 12B）。Compound-1とCompound-2は $[^3\text{H}]$ -HBT1とラット海馬膜画分の結合も阻害し、その $K_i$ 値はそれぞれ0.018と0.006  $\mu\text{M}$ であった（Figure 12C）。これらの結果から、Compound-1とCompound-2はAMPA受容体のLBDに同程度の結合親和性を有することが示唆された。Compound-1とCompound-2はGluA1i CHO細胞においてグルタミン酸依存的に $\text{Ca}^{2+}$ 流入を誘導し、その $\text{LogEC}_{50}$ はそれぞれ $-5.98 \pm 0.023$ と $-6.20 \pm 0.003$  Mであった（Figure 12D）。第1章で示したようにAMPA受容体PAMのアゴニスト作用は初代神経細胞を用いた $\text{Ca}^{2+}$ 流入アッセイでは認められるが、AMPA受容体を発現した細胞株では認められない。そのため、Compound-1とCompound-2の $\text{LogEC}_{50}$ と最大活性( $E_{\text{max}}$ )を測定するため、初代神経細胞を用いた $\text{Ca}^{2+}$ 流入アッセイでそれら2化合物を評価した。その結果、Compound-1のAMPA存在下およびAMPA非存在下での $\text{LogEC}_{50}$ と $E_{\text{max}}$ はそれぞれ $-6.33 \pm 0.037$  (128%)と $-5.30 \pm 0.234$  (14%)、Compound-2のAMPA存在下およびAMPA非存在下での $\text{LogEC}_{50}$ と $E_{\text{max}}$ はそれぞれ $-6.82 \pm 0.071$  (163%)と $-5.79 \pm 0.132$  (90%) Mであった（Figure 12E）。これらの結果から、Compound-1は初代神経細胞においてCompound-2よりもアゴニスト作用が低いことが示唆された。また、Compound-2（とCompound-1）は $[^3\text{H}]$ -AMPAのラット海馬膜画分への結合を阻害せず、逆にその結合を促進した（Figure 12F）。このことから、Compound-2のアゴニスト作用はAMPA結合部位への結合によるものではないと考えられる。



**Figure 12** Compound-1 had lower agonistic effect than Compound-2 in primary neurons. (A) Chemical structures of Compound-1 and Compound-2. (B) Displacement studies with Compound-1 and Compound-2 by SPA using [<sup>3</sup>H]-HBT1 and His-LBD. (C) Displacement studies with Compound-1 and Compound-2 by binding assay using [<sup>3</sup>H]-HBT1 and hippocampal membranes. Data (B and C) are presented as the mean  $\pm$  SD (n = 3-4). (D) Effects of Compound-1 and Compound-2 on Ca<sup>2+</sup> influx in GluA1i CHO cells in the presence or absence of 3 mM glutamate. (E) Effects of Compound-1 and Compound-2 on Ca<sup>2+</sup> influx in primary neurons in the presence or absence of 5  $\mu$ M AMPA. The experiments were repeated at least twice, and representative graphs (D and E) are shown. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3). (F) Effects of Compound-1 and Compound-2 on [<sup>3</sup>H]-AMPA binding to rat hippocampal membranes. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3).

### 2.1.2 Compound-1 は Compound-2 と異なり S743 での立体障害によりグルタミン酸依存的に AMPA 受容体に結合する

Compound-1 と Compound-2 のアゴニスト作用の違いのメカニズムを調べるため、これらの化合物の結合様式を調べた。 $[^3\text{H}]$ -Compound-1 はグルタミン酸存在下では海馬膜画分に結合したが、非存在下では結合しなかった (Figure 13A)。一方、 $[^3\text{H}]$ -Compound-2 はグルタミン酸存在下および非存在下の両方の条件において海馬膜画分に結合した (Figure 13B)。



**Figure 13** Binding of  $[^3\text{H}]$ -Compound-1 (A) or  $[^3\text{H}]$ -Compound-2 (B) to hippocampal membranes in the presence or absence of 3 mM glutamate. Non-specific binding (NSB) was determined with 10  $\mu\text{M}$  NBQX. Data (A and B) are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

次に LBD と Compound-1 と Compound-2 との相互作用について X 線結晶解析によって調べた。LBD の配列は GluA1-4 サブユニット間で高く (約 80%) 保存されている (Table 4)。また、GluA2-4 の LBD の立体構造は flip と flop のスプライシングフォームを除いて、ほぼ同一であることが報告されている<sup>39</sup>。Ca<sup>2+</sup>流入アッセイにより Compound-1 と Compound-2 のサブユニット選択性を調べたところ、両化合物ともほとんどサブユニット選択性を示さなかった (Table 5)。

**Table 4** Sequence identity among GluA1-4 subunits

	AMPA-R		
	ATD	LBD	TMD
GluA1-4	35%	80%	87%

ATD: Amino terminal domain  
LBD: Ligand binding domain  
TMD: Transmembrane domain

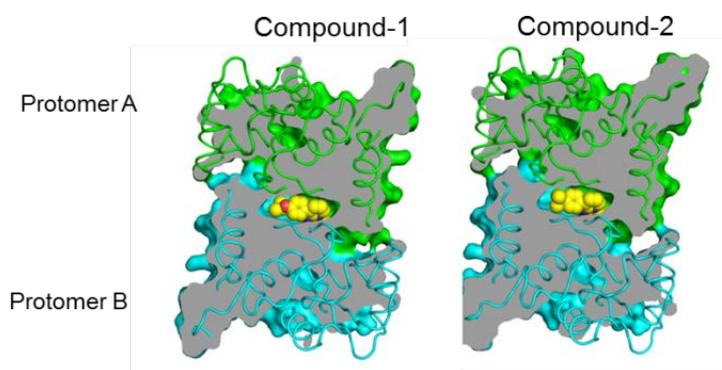
**Table 5** LogEC<sub>50</sub> values of Compound-1 and Compound-2 in Ca<sup>2+</sup> influx assay using CHO cells expressing GluA1-4i + TARPs  $\gamma$ 2 or expressing GluA1-4o + TARPs  $\gamma$ 2, or using CHO cells expressing GluK1 or GluK2.

	GluA1i	GluA2i	GluA3i	GluA4i	GluA1o	GluA2o	GluA3o	GluA4o
Compound-1	-6.00	-6.43	-6.47	-6.14	-6.00	-6.55	-5.85	-6.34
Compound-2	-6.20	-6.74	-6.72	-6.43	-6.28	-6.82	-6.52	-6.92

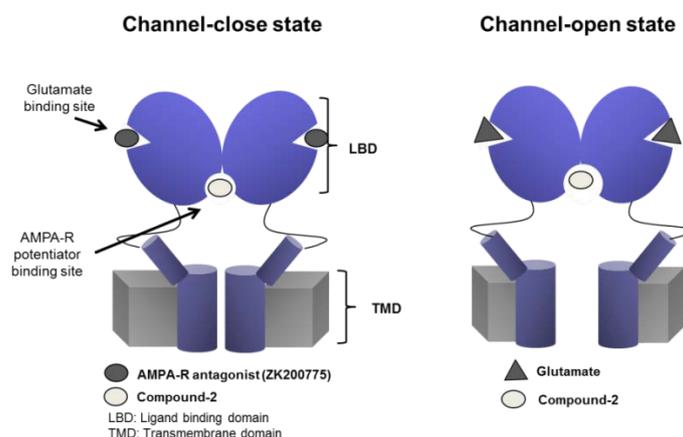
  

	GluK1	GluK2
Compound-1	> -4	> -4
Compound-2	> -4	> -4

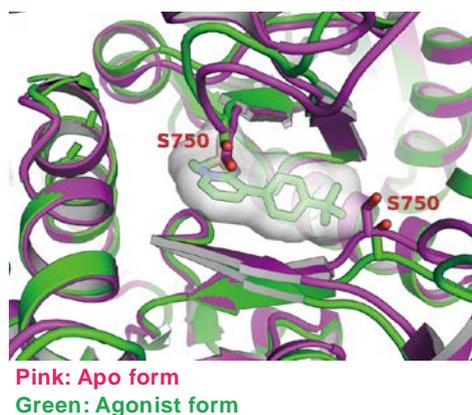
これらのことから、これまでに X 線結晶構造解析の報告でよく用いられている GluA2o-LBD を本実験に用いた。両化合物ともに 2 つの Protomer 間のダイマー境界面に形成されるポケットに結合した (Figure 14)。アゴニスト(グルタミン酸)と Compound-2 が LBD に結合した構造 (channel-open state) とアゴニストなしの状態のモデルとしてアンタゴニスト (ZK200775) と Compound-2 が LBD に結合した構造 (channel-close state) を比較した (Figure 15)。AMPA 受容体 PAM の結合部位付近での明らかな構造の違いは観察されなかったが、GluA2o の全長を用いて channel-open state と channel-close state の構造比較を行ったところ、AMPA 受容体 PAM の結合部位の近傍にある S750 の主鎖原子がアゴニストの結合によって移動することが分かった (Figure 16)。さらに、Compound-1 とは異なる化学構造部位にあたる Compound-2 の末端置換基 (tert-butyl 基) がそのセリン残基付近に位置していた。これらの結果から、S750 は Compound-2 に対してはアゴニストが結合していない受容体への結合を妨げないが、Compound-1 に対しては isopropoxy 基との立体障害によってその結合を妨げているのではないかと考えられた。



**Figure 14** Crystal structure of GluR2o LBD in complex with Compound-1 and Compound-2. Compound-1 and Compound-2 are shown in yellow and the two protomers comprising the dimer are shown in green (protomer A) and cyan (protomer B).



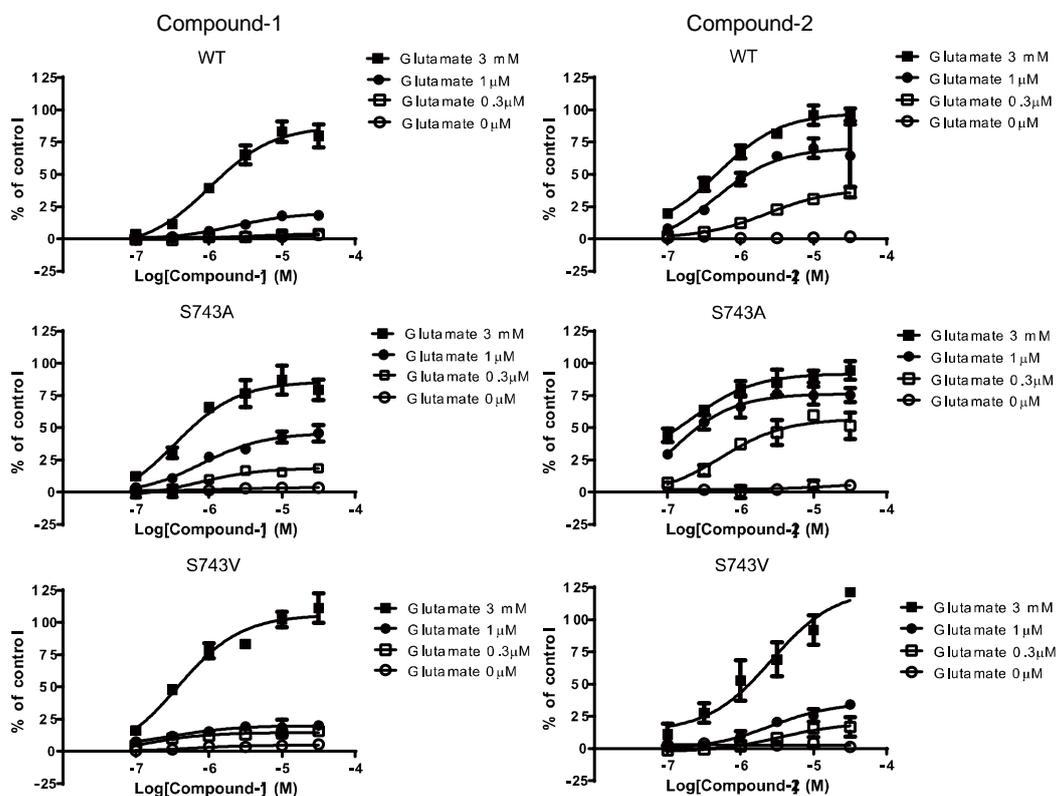
**Figure 15** AMPA-R in the channel-close state and the channel-open state.



**Figure 16** Superposition of LBDs of full-length GluA2 from the agonist form (PDB code 4U1W) and the apo form (PDB code 4U2P). Compound-2 is also superposed for reference.

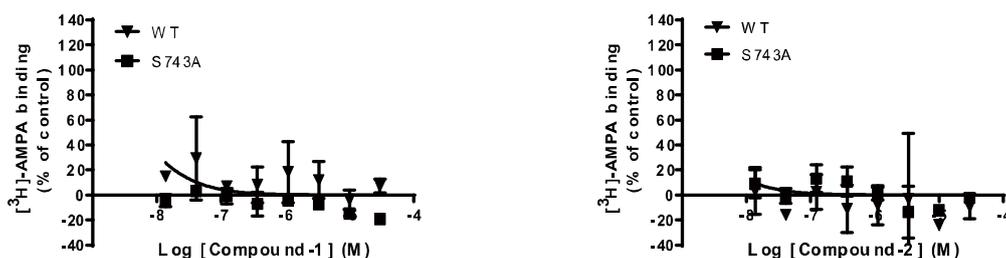
この立体障害仮説を検証するため、AMPA 受容体の変異体を用いた実験を行った。GluA2o の S750 は GluA1i の S743 に対応する。そのため、Compound-1 あるいは Compound-2 と AMPA 受容体との相互作用を解析するために GluA1i の S743 (S743A あるいは S743V) に変異を導入した。理論上は、S743A は立体障害を軽減し、S743V は立体障害を増加させると期待される。興味深いことに、GluA1i を発現させた CHO 細胞を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  流入アッセイにおいて、S743A は低濃度のグルタミン酸濃度 (0.3、1  $\mu\text{M}$ ) では Compound-1 の最大反応を増加させたが、高濃度 (3 mM) では影響なかった (Figure 17、中央左のグラフ)。一方、S743A はすべての濃度において Compound-2 の最大反応に影響を与えなかった (Figure 17、中央右のグラフ)。Compound-1 と Compound-2 はグルタミン酸がない条件では S743A GluA1i を活性化しなかった (Figure 17、中央左右のグラフ)。Compound-2 は Compound-1 と比較して低いグルタミン酸濃度 (0.3、1  $\mu\text{M}$ ) で WT GluA1i を活性化することができるが (Figure 17、上段

右のグラフ)、S743V GluA1i においてはそのグルタミン酸に対する高感受性が消失した (Figure 17、下段右のグラフ)。また、S743VはCompound-1のグルタミン酸に対する感受性に対しては影響がなかった (Figure 17、下段左のグラフ)。



**Figure 17** Effects of Compound-1 and Compound-2 on  $\text{Ca}^{2+}$  influx in CHO cells expressing GluA1i WT, GluA1i S743A, and GluA1i S743V in the presence or absence of glutamate (0.3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , and 3 mM). S743 in GluA1i LBD corresponds to S750 in GluA2o LBD. Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

S743A が化合物とアゴニストの相互作用を変化させていた場合、それぞれの化合物の GluA1i 活性に必要なグルタミン酸濃度は影響を受けると考えられる。そこで、その可能性を検証するために、 $[\text{^3H}]$ -AMPA と GluA1i WT および GluA1i S743A 発現細胞膜画分を用いた結合アッセイを行った。その結果、S743AはCompound-1あるいはCompound-2の $[\text{^3H}]$ -AMPAのGluA1iへの結合に対する作用に対して影響がなかった (Figure 18)。このことから、S743Aは化合物とアゴニストの相互作用には影響していないことが示唆された。



**Figure 18** Effects of Compound-1 and Compound-2 on [<sup>3</sup>H]-AMPA binding to GluA1i WT or GluA1i S743A. Data are presented as mean ± SD (n = 3).

## 第2節 考察

本章では、HBT1 部位に結合する新規 AMPA 受容体 PAM として、2 つの dihydropyridothiadiazine 2,2-dioxide 誘導体 Compound-1 および Compound-2 を同定した。Compound-1 は Compound-2 よりもアゴニスト作用が低かった (Figure 12E)。そして、結合アッセイや X 線結晶構造解析の結果、Compound-2 はグルタミン酸に依存せずに LBD に結合するが、Compound-1 は GluA2o の S750 (GluA1i の S743 に相当) の立体障害によりグルタミン酸に依存して LBD に結合することが明らかとなった。GluA1i の変異体を用いた Ca<sup>2+</sup>流入試験の結果、S743A では Compound-1 は isopropoxy 基と S743 の立体障害が軽減され、GluA1i 活性化に対する Compound-1 のグルタミン酸への感受性が増加した。逆に S743V では、Compound-2 の tert-butyl 基と S743 の立体障害が増加し、Compound-2 による GluA1i 活性化に必要なグルタミン酸濃度が増加した。AMPA 受容体 PAM の結合部位の構造が低濃度のグルタミン酸との相互作用により変化するという報告はないが、今回の変異体実験の結果からグルタミン酸濃度に依存して継続的に構造が変化しているのかもしれない。

## 第3節 小括

本章で得られた知見から、channel-closed state での LBD への結合親和性を有さない dihydropyridothiadiazine 2,2-dioxide 誘導体のデザインと探索が低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM の発見につながるものと考えられる。しかし、dihydropyridothiadiazine 2,2-dioxide 骨格を有さない HBT1 はグルタミン酸依存的に LBD に結合し、低アゴニスト性を示したが (Figure 4E, 8C)、S743 の立体障害ではその低アゴニスト性を説明することができなかった (data not shown)。そのため、それぞれのケモタイプごとにアゴニスト性を軽減する化合物最適化のアプローチを確立することが低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM を見出すことに有効であると考えられる。

## 第4節 実験方法

### 試薬

Compound-1 (9-(4-isopropoxyphenyl)-3,4-dihydroprido[2,1-c][1,2,4]thiadiazine

2, 2-dioxide) と Compound-2 (9-(4-tert-butylphenyl)-3, 4-dihydropyrido[2, 1-*c*][1, 2, 4]thiadiazine 2, 2-dioxide) は武田薬品工業 (株) で合成した。トリチウムラベル化合物は Quotient Bioresearch (Cambridgeshire, UK) で合成した。その他の試薬については、標準的な市販品を用いた。

#### **AMPA 受容体およびカイニン酸受容体発現細胞を用いた Ca<sup>2+</sup>流入アッセイ**

第 1 章と同様の方法で実施した。GluA1i 変異体 (GluA1i S743A と GluA1i S743V) は第 1 章で作製した GluA1i ベクターと In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio Inc) を用いて作製した。

#### **初代神経細胞を用いた Ca<sup>2+</sup>流入アッセイ**

第 1 章と同様の方法で実施した。

#### **Scintillation proximity assay (SPA)**

第 1 章と同様の方法で実施した。

#### **海馬膜画分を用いた結合アッセイ**

第 1 章と同様の方法で実施した。 [<sup>3</sup>H]-Compound-1 と [<sup>3</sup>H]-Compound-2 を用いた結合試験では、それぞれのラベル体を 30 nM と 10 nM の濃度で使用し、非特異的結合は 10 μM NBQX を用いて決定した。

#### **GluA1i CHO 細胞膜画分と [<sup>3</sup>H]-AMPA を用いた結合アッセイ**

GluA1i CHO 細胞を氷冷した PBS (-) で 2 回洗浄した後、Assay buffer (50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)) で回収した。細胞懸濁液を 10,000g、10 分 (4° C) で遠心し、ペレットをテフロンホモジナイザーで 15 秒間、氷冷した Assay buffer 中で懸濁した。懸濁液を 20,000g、20 分 (4° C) で遠心した後、ペレットを 2.5 ml の Assay buffer に懸濁し、-80° C で実験に使用するまで保存した。0.1 mg の膜タンパク質、2 nM [<sup>3</sup>H]-AMPA、化合物、50 mM KSCN、0.01% NP-40、Assay buffer (最終用量 1.0 mL) の混合液を調製した。非特異的結合は 100 μM AMPA を添加した際の値を用いた。混合液を氷上で 1 時間インキュベートし、0.03% polyethylenimine にプレソークした GF/B filters に通し、20 mL の氷冷した Wash buffer (50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 50 mM KSCN) で洗浄した。フィルター上に残った放射活性を液体シンチレーションカウンター (LSC-6100, ALOKA) で測定した。タンパク質量は bicinchoninic acid assay method (Thermo Fisher Scientific Inc.) で測定した。

#### **GluA2o LBD/化合物複合体の X線結晶構造解析**

第 1 章と同様の方法で実施した。回折データ処理と結晶構造の精密化の統計値は下記の

テーブル (Table 6) に示した。

**Table 6** Crystallographic data collection and refinement statistics

Crystal	GluA2o LBD/ glutamate/Compound-1	GluA2o LBD/ glutamate/Compound-2	GluA2o LBD/ ZK200775/Compound-2
<b>Data collection</b>			
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>
Unit cell dimensions			
a, b, c (Å)	113.7, 162.6, 47.4	47.1, 64.6, 90.3	49.4, 56.6, 90.8
α, β, γ (°)	90, 90.0, 90	90, 90.0, 90	90, 91.8, 90
Resolution (Å)	50–1.58 (1.61–1.58)	50–1.32 (1.34–1.32)	50–1.25 (1.27–1.25)
Observed reflections	766431	460919	428324
Unique reflections	222823 (10721)	122835 (4506)	128359 (4044)
Redundancy	3.4 (3.4)	3.8 (2.3)	3.3 (2.4)
Completeness (%)	95.2 (92.9)	96.6 (70.7)	93.1 (59.0)
I/σ	17.9 (1.4)	17.9 (2.2)	19.5 (1.8)
R <sub>sym</sub> <sup>1</sup>	0.062 (0.903)	0.065 (0.415)	0.053 (0.517)
Wilson B factor (Å <sup>2</sup> )	16.1	10.1	7.9
Molecules in ASU	6	2	2
<b>Refinement</b>			
Resolution (Å)	40–1.58 (1.62–1.58)	40–1.32 (1.35–1.32)	40–1.25 (1.28–1.25)
Reflections	211606 (14950)	116541 (6408)	121789 (5944)
R <sub>work</sub> <sup>2</sup>	0.193 (0.285)	0.161 (0.229)	0.169 (0.269)
R <sub>free</sub> <sup>2</sup>	0.221 (0.302)	0.184 (0.238)	0.190 (0.250)
Number of atoms			
Protein	12367	4136	4110
Ligand/Ion	232	120	127
Water	1093	562	652
Average B factor (Å <sup>2</sup> ) <sup>3</sup>	31.7	20.7	16.8
R.m.s. deviation from ideal geometry			
bond lengths (Å)	0.009	0.011	0.011
bond angles (°)	1.355	1.467	1.499
Ramachandran plot (%) <sup>4</sup>			
Preferred regions	98.2	99.0	99.4
Allowed regions	1.7	1.0	0.2
Disallowed regions	0.1	0.0	0.4
<b>PDB code</b>	5ZG0	5ZG1	5ZG2

<sup>1</sup>  $R_{sym} = \frac{\sum_h \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i \langle I(h) \rangle}$ , where  $\langle I(h) \rangle$  is the mean intensity of symmetry-related reflections. <sup>2</sup>  $R_{work} = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$ .  $R_{free}$  was calculated for randomly chosen 5% of reflections excluded from refinement. <sup>3</sup> B-factor includes contributions from TLS parameters. <sup>4</sup> Calculated with Coot. Values in parentheses are for the highest resolution shell.

### 第3章 ベルシェイプ型反応性および痙攣のリスクを軽減した低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM TAK-137

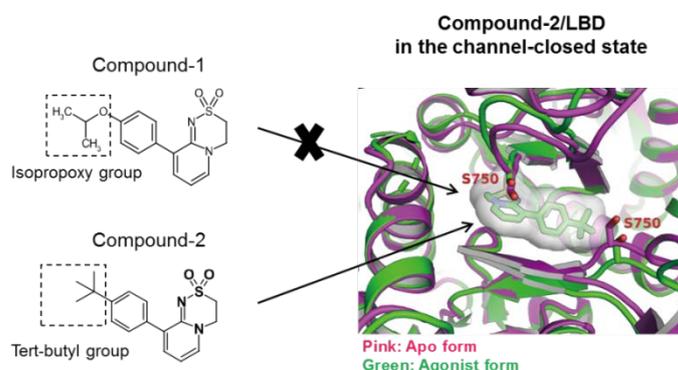
#### 緒言

第2章では dihydropyridothiadiazine 2,2-dioxide 誘導体のアゴニスト作用の軽減には AMPA 受容体の 743 番目のセリンとの立体障害に着目した最適化合成が有効であることが示唆された。本章では、それらの知見に基づいて見出された臨床候補化合物 TAK-137 の薬効および副作用の評価を LY451646 (アゴニスト性が高い AMPA 受容体 PAM) と比較して行った。

#### 第1節 結果

##### 3.1.1 TAK-137 は LY451646 よりもアゴニスト作用が低い

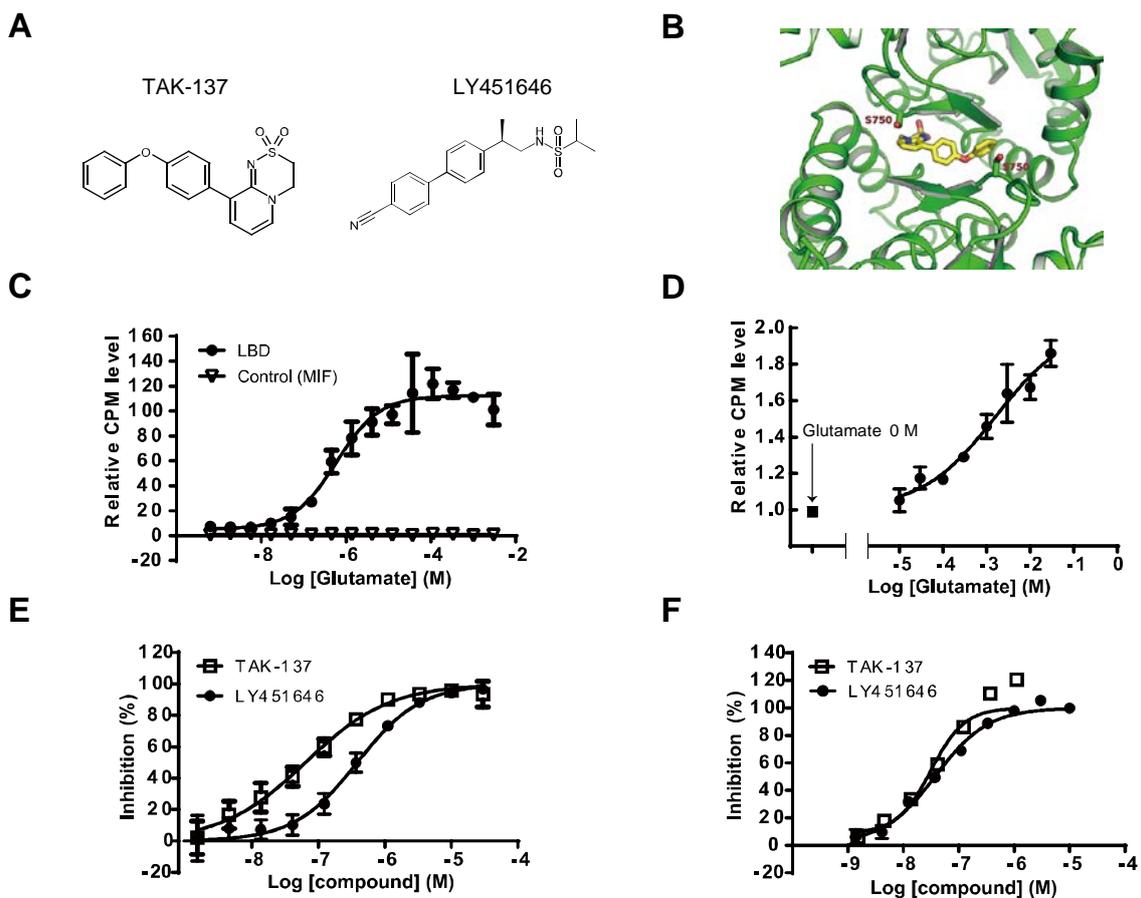
第2章で記載したようにアゴニスト性の高い Compound-2 は tert-butyl 基と S750 (GluA1i の S743 に相当) との立体障害が少ないため channel-closed state の LBD に結合するが、アゴニスト性の低い Compound-1 は isopropoxy 基と S750 との立体障害により結合できないことが明らかとなった (Figure 19)。そのため、dihydropyridothiadiazine 2,2-dioxide 誘導体のアゴニスト性を軽減するには、GluA1i の S743 での立体障害により channel-closed state の LBD への結合親和性を最小限になる化合物デザインが有効と考えられる。



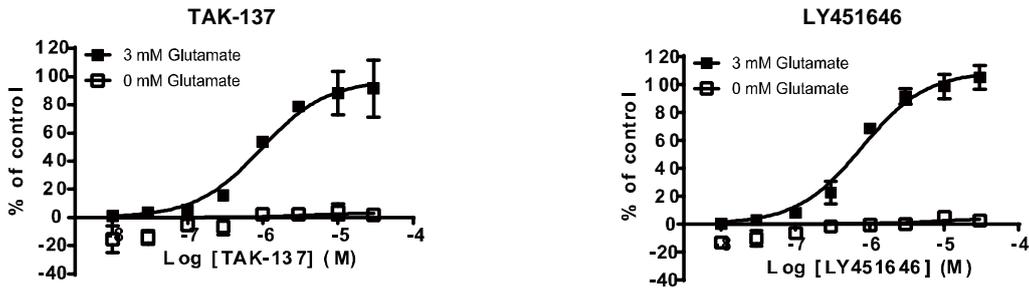
**Figure 19** Compound-2 bound to the LBD of AMPA-R in the channel-closed state.

これらの知見に基づき、合成の最適化研究を行い、最終的に TAK-137 を臨床候補化合物として見出した (Figure 20A)。TAK-137 は2つの Protomer 間のダイマー境界面に形成されるポケットに結合し、TAK-137 の立体的にかさ高い Phenoxy 基は S750 付近に位置していた (Figure 20B)。そして、 $[^3\text{H}]$ -TAK-137 は His-LBD と海馬膜画分にグルタミン酸依存的に結合した (Figure 20C, 20D)。LY451646 (Figure 20A) も AMPA 受容体の LBD に結合することが報告されており<sup>13,27</sup>、両化合物の LBD への結合親和性を調べたところ、TAK-137 と LY451646 は $[^3\text{H}]$ -HBT1 のLBDに対する結合を阻害し、その $K_i$ 値はそれぞれ0.061および0.363

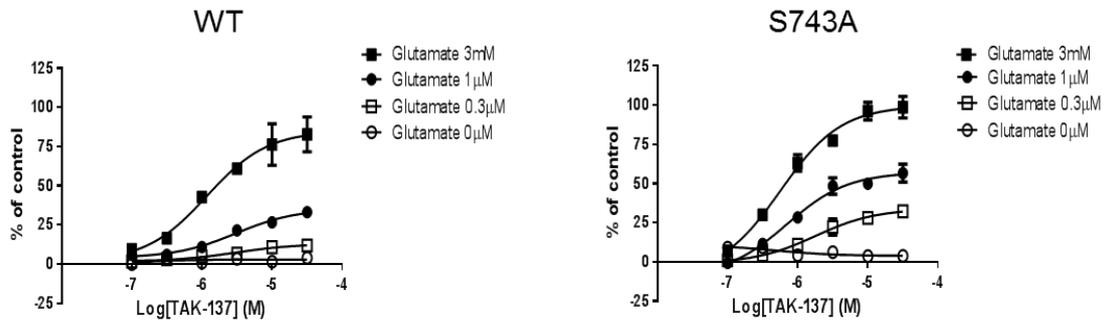
$\mu\text{M}$ であった (Figure 20E)。TAK-137 と LY451646 は $[\text{}^3\text{H}]$ -HBT1 の海馬膜画分に対する結合も阻害し、その  $K_i$  値はそれぞれ  $0.025$  と  $0.031 \mu\text{M}$ であった (Figure 20F)。また、TAK-137 と LY451646 は GluA1i CHO 細胞においてアゴニスト依存的に  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を誘導し、その  $\text{LogEC}_{50}$  はそれぞれ  $-5.98 \pm 0.021$  と  $-6.10 \pm 0.014 \text{ M}$ であった (Figure 21)。第2章の Compound-1 の結果と同様に、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入アッセイにおいて S743A は TAK-137 による GluA1i 活性化に必要なグルタミン酸濃度を低下させた (Figure 22)。



**Figure 20** TAK-137 bound to the LBD of AMPA-R. (A) Chemical structure of TAK-137 and LY451646. (B) Crystal structure of GluA2o LBD in complex with TAK-137. (C, D) Effects of glutamate on the binding of  $[\text{}^3\text{H}]$ -TAK-137 to His-LBD (C) and hippocampal membranes (D). Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). (E, F) Displacement studies with TAK-137 and LY451646 by SPA using  $[\text{}^3\text{H}]$ -HBT1 and His-LBD and binding assay using  $[\text{}^3\text{H}]$ -HBT1 and hippocampal membranes. Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ -4).

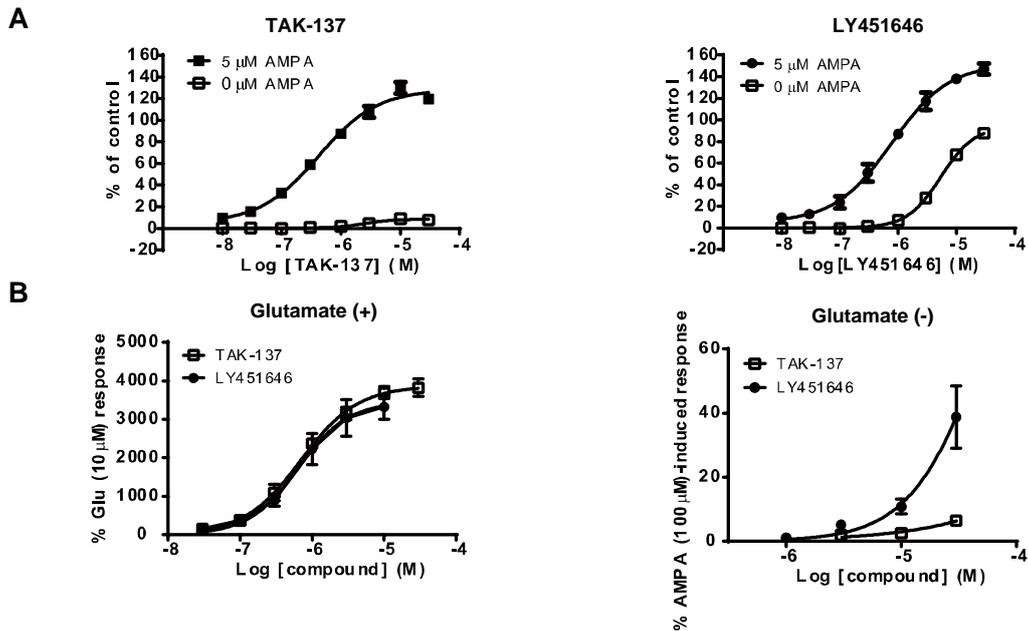


**Figure 21** Effects of TAK-137 and LY451646 on  $\text{Ca}^{2+}$  influx in GluA1i CHO cells in the presence or absence of agonist. The experiments were repeated at least twice, and representative graphs are shown. Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

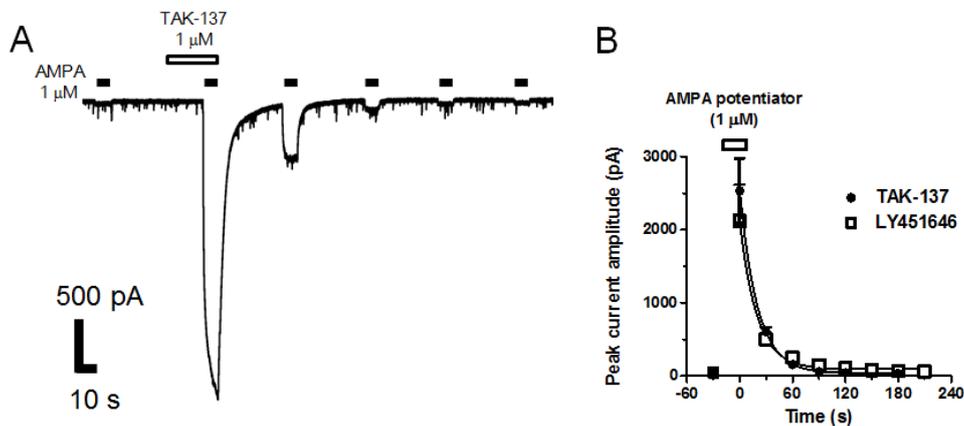


**Figure 22** Effects of TAK-137 on  $\text{Ca}^{2+}$  influx in CHO cells expressing GluA1i WT or GluA1i S743A in the absence or presence of glutamate (0.3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , and 3 mM). Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

LY451646は初代神経細胞を用いたBDNFアッセイで強いアゴニスト作用を示したことから (Figure 2B)、初代神経細胞における TAK-137 と LY451646 のアゴニスト作用の比較をした。TAK-137 は初代神経細胞においてアゴニスト依存的に  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を誘導したが、LY451646 は AMPA 存在下、非存在下で  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を誘導した (Figure 23A)。TAK-137 の AMPA 存在下、非存在下での  $\text{LogEC}_{50}$  ( $E_{\text{max}}$ )はそれぞれ  $-6.36 \pm 0.020$  (126%)と  $-5.64 \pm 0.019$  (10%) M、LY451646 の  $\text{LogEC}_{50}$  ( $E_{\text{max}}$ )はそれぞれ  $-6.30 \pm 0.193$  (148%)と  $-5.23 \pm 0.033$  (86%) M であった。また、初代神経細胞を用いたパッチクランプアッセイで評価したところ、TAK-137 はグルタミン酸存在下でのみ AMPA 受容体を介した電流を誘導したが、LY451646 はグルタミン酸存在下、非存在下の両方の条件で AMPA 受容体を介した電流を誘導した (Figure 23B)。以上の結果から、TAK-137 は LY451646 よりもアゴニスト作用が低いと考えられる。



**Figure 23** TAK-137 had lower agonistic effects than LY451646. (A) Effects of TAK-137 and LY451646 on  $Ca^{2+}$  influx in primary neurons in the presence or absence of agonist. The experiments were repeated at least twice, and representative graphs are shown. Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). (B) Effects of TAK-137 and LY451646 on AMPA receptor-mediated currents in the presence or absence of 10  $\mu$ M glutamate in electrophysiological study using primary neurons. Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4-9$ ).



**Figure 24** The reversible effect of TAK-137 and LY451646 potentiator activity. (A) Representative AMPA responses (1  $\mu$ M, 6 s duration) before, during and after application of TAK-137 (1  $\mu$ M) were depicted. (B) Data points are plotted as a percentage of the AMPA (1  $\mu$ M) response amplitude before application of TAK-137 or LY451646 ( $n = 4$ ). Value was shown as mean amplitude  $\pm$  SEM.

AMPA 受容体の活性化は痙攣を誘導するリスクがある<sup>17</sup>。したがって、AMPA 受容体の活性化状態からベースの状態への回復が遅いと AMPA 受容体の活性化が持続し、痙攣を誘導する可能性が考えられる。しかし、初代神経細胞を用いた電気生理試験において、TAK-137 と LY451646 による AMPA 受容体の活性化からのリカバリーの時間はほぼ同程度であった (Figure 24)。この結果から、これらの化合物は持続的な AMPA 受容体の活性化を引き起こさないことが示唆された。また、AMPA 受容体 PAM のサブユニット選択性もその機能発現に影響を与える可能性がある<sup>26</sup>。しかし、TAK-137 と LY451646 はほとんどサブユニット選択性を示さないことがわかった (Table 7)。これらのことから、TAK-137 と LY451646 のプロファイルはアゴニスト活性を除いて非常に類似していた。

**Table 7** LogEC<sub>50</sub> values of TAK-137 and LY451646 in Ca<sup>2+</sup> influx assay using CHO cells expressing GluA1-4i + TARPs  $\gamma$ 2 or expressing GluA1-4o + TARPs  $\gamma$ 2, or using CHO cells expressing GluK1 or GluK2.

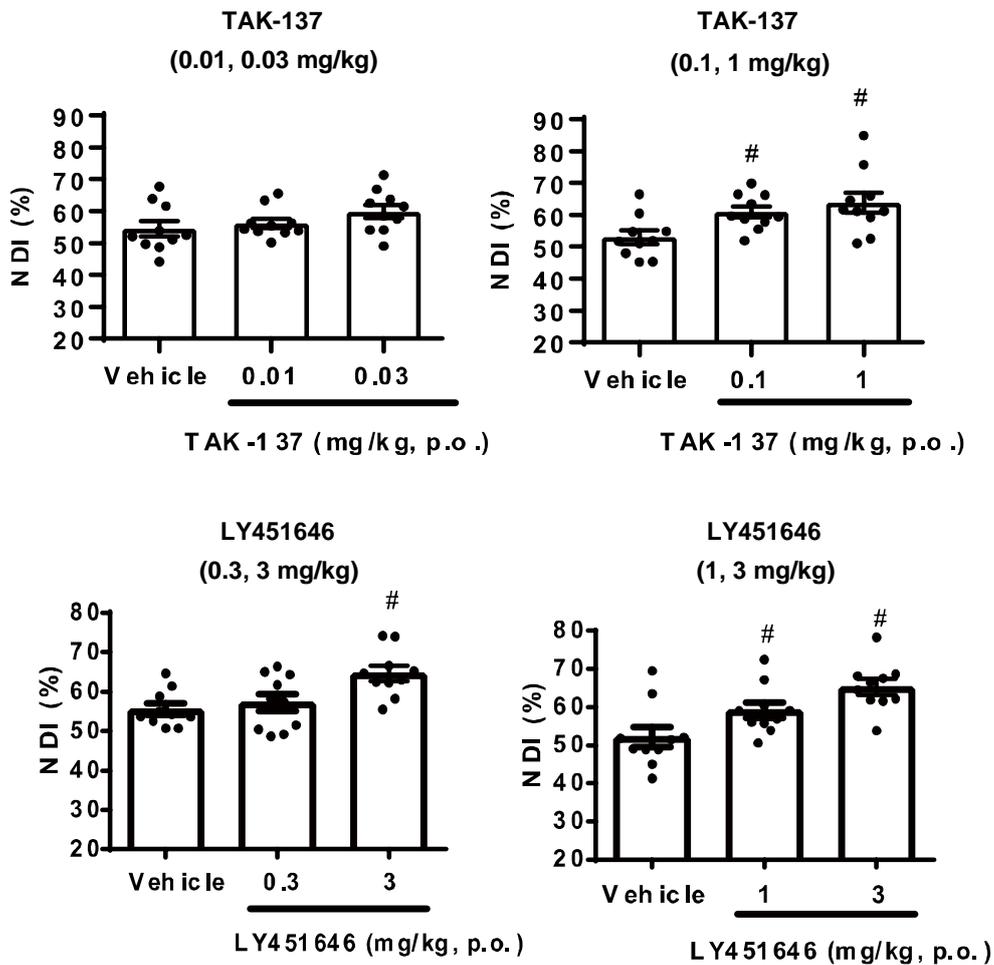
	GluA1i	GluA2i	GluA3i	GluA4i	GluA1o	GluA2o	GluA3o	GluA4o
TAK-137	-6.02	-6.92	-7.00	-6.24	-6.36	-7.30	-6.12	-6.51
LY451646	-6.11	-7.00	-7.70	-6.64	-5.57	-6.06	-5.82	-5.89

	GluK1	GluK2
TAK-137	> -4	> -4
LY451646	> -4	> -4

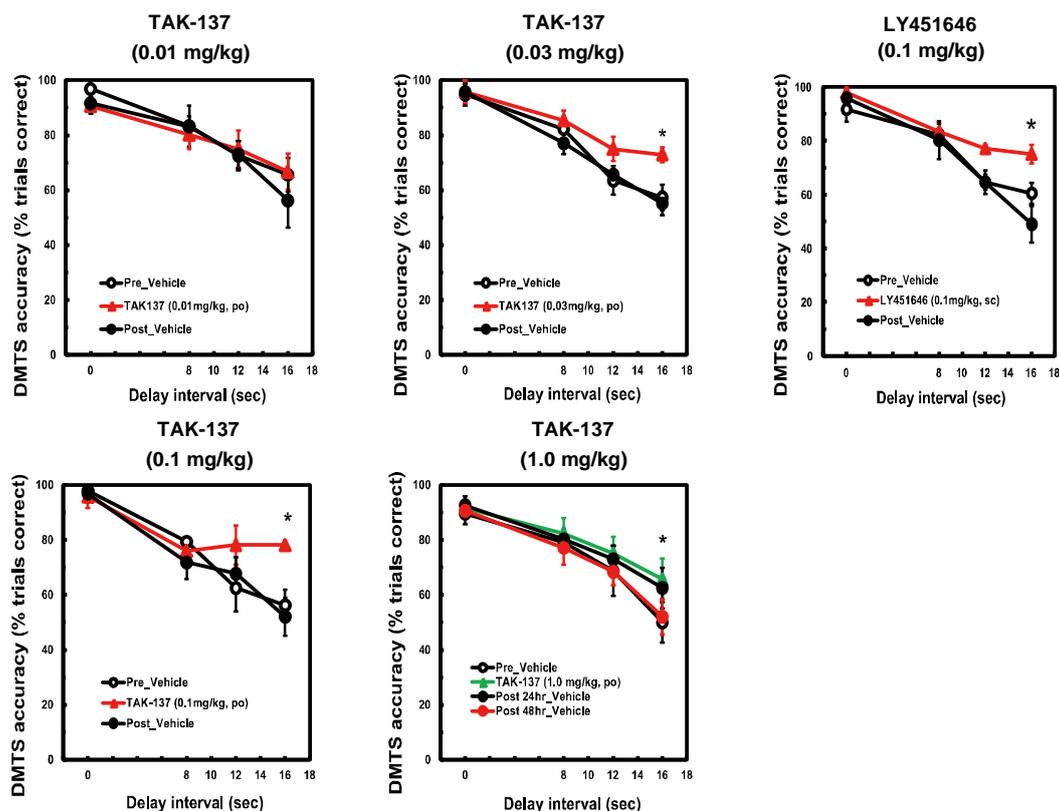
### 3.1.2 TAK-137 はラットおよびサルにおいて強い認知改善作用を有する

AMPA 受容体 PAM は種々の認知機能試験において認知改善作用を示すことが報告されている<sup>12,13</sup>。そこで、TAK-137 と LY451646 のラットおよびサルにおける認知改善作用を調べた。TAK-137 は 0.01 と 0.03 mg/kg, p.o. ではラット Novel object recognition test (NORT) の Novelty discrimination index (NDI)に影響しなかったが、0.1 と 1 mg/kg, p.o. では有意に NDI を増加させた (Figure 25)。一方、LY451646 は 0.3 mg/kg, p.o. では NDI に影響しなかったが、1 と 3 mg/kg, p.o. では有意に NDI を増加させた (Figure 25)。



**Figure 25** Cognitive-enhancing effects of TAK-137 and LY451646 on rat NORT. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 10$ ). Significant difference from vehicle-treated group was analyzed using the one-tailed Williams' test (TAK-137: # $P \leq 0.025$ ,  $df = 27$ ,  $t = 2.3$  (0.1 mg/kg), 3.2 (1 mg/kg), LY451646: # $P \leq 0.025$ ,  $df = 27$ ,  $t = 2.2$  (1 mg/kg), 4.2 (3 mg/kg)).

TAK-137 は 0.01 mg/kg, p.o. ではサル delayed matching-to-sample (DMTS) 試験での正答率 (DMTS accuracy) に影響しなかったが、0.03、0.1、1 mg/kg, p.o. では有意に正答率を増加させた (Figure 26)。LY451646 は 0.03 mg/kg, s.c. では DMTS 試験での正答率 (DMTS accuracy) に影響しなかった (data not shown) が、0.1 mg/kg, s.c. では有意に正答率を増加させた (Figure 26)。以上の結果から、TAK-137 はサルにおける認知改善作用においてベルシェイプ反応性のリスクが低いことが示唆された。ただし、TAK-137 の 0.01 と 1 mg/kg の評価に用いたサルと他の用量の評価に用いたサルは異なるため、作用強度の直接比較はできなかった。



**Figure 26** Cognitive-enhancing effects of TAK-137 and LY451646 on monkey DMTS task. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Significant difference from vehicle-treated group was analyzed using two-way ANOVA (TAK-137:  $*P \leq 0.05$ ,  $F_{1,6} = 4.0$  (0.03 mg/kg),  $F_{1,6} = 6.7$  (0.1 mg/kg),  $F_{1,6} = 6.1$  (1 mg/kg), LY451646:  $*P \leq 0.05$ ,  $F_{1,6} = 7.2$  (0.1 mg/kg)).

### 3. 1. 3 TAK-137 はラットおよびサルにおいて広い安全域を有する

ラットとサルを用いて TAK-137 と LY451646 の痙攣作用について検討した。TAK-137 の単回投与では 1000 mg/kg, p. o. までラットで痙攣は誘導されなかった (Table 8)。通常の剤形よりも血中暴露量が高くなるナノクリスタルの剤形では、TAK-137 は 100 mg/kg, p. o. の単回投与で痙攣を誘導した (Table 8)。LY451646 は 10 および 30 mg/kg, p. o. の単回投与でラットにおいて痙攣を誘導した (Table 8)。TAK-137 はサルにおいては 100 mg/kg, p. o. まで痙攣を誘導しなかった (Table 8)。LY451646 は 1 mg/kg, s. c. でサルにおいて嘔吐を誘導したため、それ以上の高用量の投与を行わなかった。これらの結果に基づいて、ラットにおける TAK-137 と LY451646 の認知改善作用と痙攣を誘導しない用量の暴露のマーヅンを算出した。計算には、化合物の  $AUC_{\text{brain}}$  と  $\text{brain } C_{\text{max}}$  の値を用いた (Table 9、10)。その結果、TAK-137 はラットでは 116 倍 ( $AUC_{\text{brain}}$ ) と 43.7 倍 ( $\text{brain } C_{\text{max}}$ ) の暴露マーヅンがあったが、LY451646 は 3.1 倍 ( $AUC_{\text{brain}}$ ) と 7.5 倍 ( $\text{brain } C_{\text{max}}$ ) であった。サルにおける TAK-137 の暴露マーヅンの計算には、 $AUC_{\text{plasma}}$  と  $\text{plasma } C_{\text{max}}$  の値を用いた (Table 11)。TAK-137 はサルにおいて少なくとも 49 倍 ( $AUC_{\text{plasma}}$ ) と 48 倍 ( $\text{plasma } C_{\text{max}}$ ) の暴露マーヅンがあった。

**Table 8** Rates of seizure in rats and monkeys after acute treatment of compounds. Rats (n=3) and monkeys (n=4) were administered TAK-137 and observed for up to 8 h after the administration. Rats (n=3) were administered LY451646 and observed for up to 4 h after the administration.

		10 mg/kg	100 mg/kg	1000 mg/kg	100 mg/kg (Nanocrystal)
TAK-137	Rat	0%	0%	0%	33%
	Monkey	0%	0%	-	-
		1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg
LY451646	Rat	-	0%	33%	100%
	Monkey	-*	-	-	-

\*: Acute treatment of LY451646 at 1 mg/kg, s.c. induced vomiting in monkeys.

**Table 9** Pharmacokinetic profile of TAK-137 in rats. TAK-137 was orally administrated to rats (n = 3).

		Dose (mg/kg, p.o.)	Sample	C <sub>max</sub> (ng/ml or g)	AUC <sub>0-24h</sub> (ng·h/ml or g)	C <sub>max,u</sub> (ng/ml or g)	AUC <sub>0-24h, u</sub> (ng·h/ml or g)
TAK-137	0.1		Plasma	25	113	0.65	2.94
			Brain	7	31	0.20	0.90
	1000		Plasma	1062	13769	27.61	357.99
			Brain	306	4065	8.87	117.89
	100 (Nanocrystal)		Plasma	1901	20639	49.43	536.61
			Brain	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

C<sub>max,u</sub> and AUC<sub>0-24h, u</sub>: unbound compound concentrations.

**Table 10** Pharmacokinetic profile of LY451646 in rats. LY451646 was orally administrated to rats (n = 3).

		Dose (mg/kg, p.o.)	Sample	C <sub>max</sub> (ng/ml or g)	AUC <sub>0-24h</sub> (ng·h/ml or g)	C <sub>max,u</sub> (ng/ml or g)	AUC <sub>0-24h, u</sub> (ng·h/ml or g)
LY451646	1		Plasma	188	1124	5.64	33.72
			Brain	235	1327	2.12	11.94
	3		Plasma	646	4536	19.38	136.08
			Brain	727	4892	6.54	44.03

C<sub>max,u</sub> and AUC<sub>0-24h, u</sub>: unbound compound concentrations.

**Table 11** Pharmacokinetic profile of TAK-137 in monkeys. TAK-137 was orally administrated to monkeys (n = 4).

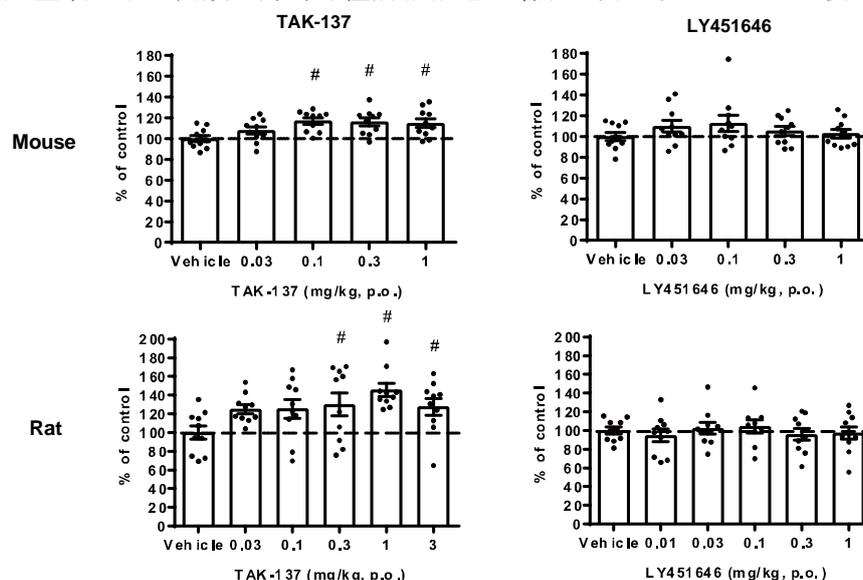
	Dose (mg/kg, p.o.)	Sample	C <sub>max</sub> (ng/ml)	AUC <sub>0-24h</sub> (ng·h/ml)	C <sub>max,u</sub> (ng/ml)	AUC <sub>0-24h, u</sub> (ng·h/ml)
TAK-137	0.1	Plasma	40	775	0.76	14.73
	100	Plasma	580	11375	11.02	216.13

C<sub>max,u</sub> and AUC<sub>0-24h, u</sub>: unbound compound concentrations.

Note: C<sub>max</sub> and AUC<sub>0-24h</sub> at 0.03 mg/kg, p.o. are estimated based on C<sub>max</sub> and AUC<sub>0-24h</sub> at 0.1 mg/kg, p.o.

### 3.1.4 TAK-137 は LY451646 よりも広い用量域でげっ歯類の海馬神経前駆細胞の増殖を促進する

LY451646 はラットの海馬において神経前駆細胞の増殖を促進するが、その作用はベルシェイプ型の反応であることが報告されている。TAK-137 が LY451646 よりも広い用量で作用を示すのか、TAK-137 と LY451646 の神経前駆細胞の増殖に対する作用を調べた。TAK-137 は 0.1-1 mg/kg, p.o. (マウス) と 0.3-3 mg/kg, p.o. (ラット) で有意に BrdU 陽性細胞数を増やしたが、LY451646 による BrdU 陽性細胞数の増加作用は今回の実験条件においては 1 mg/kg, p.o. まで観察されなかった (Figure 27)。これらのことから TAK-137 は LY451646 よりも広い用量域でげっ歯類の海馬神経前駆細胞の増殖を促進することが示唆された。



**Figure 27** Effects of TAK-137 and LY451646 on the number of BrdU-positive cells in mouse or rat hippocampus. TAK-137 or LY451646 was orally administered to mice or rats for 4 days and tissues were isolated the next day. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 9-10). Significant difference from vehicle-treated group was analyzed using the one-tailed Williams' test (mouse: #P  $\leq$  0.025, df = 45, t = 3.3 (0.1 mg/kg), 3.2 (0.3 mg/kg), 3.1 (1 mg/kg), rat: #P  $\leq$  0.025, df = 54, t = 2.4 (0.3 mg/kg), 3.7 (1 mg/kg), 3.0 (3 mg/kg)).

## 第2節 考察

S743での立体障害によりアゴニスト作用が軽減されるという仮説に基づき、LY451646よりもアゴニスト作用の低いTAK-137を見出した。TAK-137はラットにおいて痙攣に対する広い安全域を有しており、その安全域(116倍( $AUC_{\text{brain}}$ )、43.7倍( $\text{brain } C_{\text{max}}$ ))はLY451646の安全域(3.1倍( $AUC_{\text{brain}}$ )、7.5倍( $\text{brain } C_{\text{max}}$ ))よりも広がった。さらに、サルにおいてもTAK-137は広い安全域を(>49倍( $AUC_{\text{plasma}}$ )、>48倍( $\text{plasma } C_{\text{max}}$ ))有していた。

TAK-137は広い用量域で(0.1-1mg/kg, p.o. (マウス)、0.3-3 mg/kg, p.o. (ラット))海馬の神経前駆細胞の増殖を促進した。さらに、サルのDMTS試験においても広い用量(0.03-1 mg/kg, p.o.)で認知改善作用を示した。これらのことからTAK-137はLY451646よりもベルシェイプ型反応性のリスクが低いことが示唆された。これまでの報告と異なり<sup>20</sup>、私が実施した試験系では、LY451646は有意な神経前駆細胞の増殖促進作用が認められなかった。LY451646の神経前駆細胞の増殖促進作用やBDNF mRNA発現促進作用の薬効用量は投与期間によって変化することが報告されている<sup>20,23</sup>。そのため、投与期間などの試験系の最適化を試みたが、LY451646が有意な作用を示す条件を設定できなかった。

## 第3節 小括

本章では、dihydropyridothiadiazine 2,2-dioxides誘導体の最適化研究により低アゴニスト性AMPA受容体PAMであるTAK-137を見出した。TAK-137は既存のAMPA受容体PAM LY451646よりも広い用量域で認知改善作用等を示し、また、痙攣リスクが低いことがわかった。これらのことから、第1章および第2章で提唱したスクリーニングアプローチおよび化合物最適化戦略はベルシェイプ型の反応性および痙攣リスクを軽減したAMPA受容体PAMを見出す上で有用であることが示唆された。

## 第4節 実験方法

### 試薬

第1章および第2章で得られた知見を基に、武田薬品工業(株)でdihydropyridothiadiazine 2,2-dioxide誘導体から化合物の最適化研究を行い、種々のスクリーニングを経て臨床候補化合物としてTAK-137を合成した。その他の試薬については標準的な市販品を用いた。

### AMPA受容体およびカイニン酸受容体発現細胞を用いたCa<sup>2+</sup>流入アッセイ

第2章と同様の方法で実施した。

### 初代神経細胞を用いたCa<sup>2+</sup>流入アッセイ

第1章と同様の方法で実施した。

## 初代神経細胞を用いたパッチクランプアッセイ

第1章と同様の方法で実施した。

## Scintillation proximity assay (SPA)

第1章と同様の方法で実施した。

## 海馬膜画分を用いた結合アッセイ

第1章と同様の方法で実施した。[<sup>3</sup>H]-TAK-137を用いた結合試験では、ラベル体を30 nMの濃度で使用し、非特異的結合は10 μM NBQXを用いて決定した。

## GluA2o LBD/化合物複合体のX線結晶構造解析

第1章と同様の方法で実施した。結晶構造のプロセッシングと精密化の統計は下記のテーブル (Table 12) にまとめた通りである。

**Table 12** Crystallographic data collection and refinement statistics

Crystal	GluA2o LBD/ glutamate/TAK-137
<b>Data collection</b>	
Space group	<i>P2<sub>1</sub></i>
Unit cell dimensions	
a, b, c (Å)	114.1, 162.3, 47.4
α, β, γ (°)	90, 90.0, 90
Resolution (Å)	50–1.65 (1.68–1.65)
Observed reflections	770416
Unique reflections	205163 (10206)
Redundancy	3.8 (3.6)
Completeness (%)	99.6 (99.1)
I/σ	19.0 (1.5)
R <sub>sym</sub> <sup>1</sup>	0.062 (0.841)
Wilson B factor (Å <sup>2</sup> )	20.8
Molecules in ASU	6
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	40–1.65 (1.69–1.65)
Reflections	194547 (14054)
R <sub>work</sub> <sup>2</sup>	0.184 (0.278)
R <sub>free</sub> <sup>2</sup>	0.215 (0.313)
Number of atoms	
Protein	12300
Ligand/Ion	216
Water	1062
Average B factor (Å <sup>2</sup> ) <sup>3</sup>	31.1
R.m.s. deviation from ideal geometry	
bond lengths (Å)	0.010
bond angles (°)	1.339
Ramachandran plot (%) <sup>4</sup>	
Preferred regions	98.2
Allowed regions	1.7
Disallowed regions	0.1
<b>PDB code</b>	5ZG3

<sup>1</sup>  $R_{sym} = \sum_h \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i \langle I(h) \rangle$ , where  $\langle I(h) \rangle$  is the mean intensity of symmetry-related reflections. <sup>2</sup>  $R_{work} = \sum |F_{obs} - F_{calc}| / \sum |F_{obs}|$ .  $R_{free}$  was calculated for randomly chosen 5% of reflections excluded from refinement. <sup>3</sup> B-factor includes contributions from TLS parameters. <sup>4</sup> Calculated with Coot. Values in parentheses are for the highest resolution shell.

## 動物

C57BL/6J マウス、Sprague-Dawley (IGS) ラット、Long-Evans ラットは明暗サイクルがコントロールされた飼育室で群飼育し (12-h light/dark)、実験前に 1 週間以上の馴化飼育を行った。サルは明暗サイクルがコントロールされた飼育室に個別飼育した (12 h-light/dark cycle)。動物の飼育および使用、実験プロトールは武田薬品動物実験委員会の承認を得た。

## 薬物投与

TAK-137 と LY451646 は 0.5% (w/v) methylcellulose 蒸留水に懸濁し、経口投与 (p. o.) した。DMTS 試験では LY451646 は 10% cremophor (W/V) 蒸留水に溶解し、皮下投与 (s. c.) した。

## 海馬神経前駆細胞の増殖

Brdu 陽性核数の測定はフローサイトメトリーを用いた既報に従い実施した<sup>40</sup>。

## Novel Object Recognition Test (NORT)

NORT は既報に従い実施した<sup>41</sup>。

## DMTS 試験

DMTS 試験には 4-6 年齢の雄のカニクイザル (Keari Co., Ltd.) を用いた。実験期間中、サルの体重は自由に摂餌ができる時の 80% に維持した。試験には Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB) system (CeNes, Cambridge) を用い、4 匹のサルをトレーニングした。試験 (1 トライアル) では最初に 1 つの物体サンプルの画像がスクリーンに表示される。サルが 30 秒以内にその物体をタッチすると正答反応となる。その後、その物体はスクリーンから消え、種々のディレイ (0、4、8、16 秒) を空けた後、最初に提示された物体とともに 3 つの異なる形の物体が提示される。サルがその 4 つの物体から最初に提示された物体をタッチすると正答反応となり、報酬として餌が与えられる。トライアルの間隔は 5 秒で、1 つの試験で 96 トライアルを行った。0、4、8、16 秒のディレイのトライアルをそれぞれ 24 回行い (合計 96 トライアル)、それらは 96 トライアルの中でランダムに行われた。実験には 70% 以上の正答率を示すサルが用いられた。化合物評価の際は、TAK-137 (0.01、0.03、0.1、1 mg/kg p. o.) と LY451646 (0.1 mg/kg s. c.) を試験 2 時間前にサルに投与した。vehicle を用いたコントロールの試験は化合物を投与する前と後の 2 度行った。すべてのトライアルでの正答数を記録し、それらを 4 つのディレイごとに分けて、それらディレイ毎での正答率を算出した。

## 痙攣評価

TAK-137 (10、100、1000 mg/kg)、ナノクリスタル剤形の TAK-137 (100 mg/kg)、LY451646 (3、10、30 mg/kg) を経口で 6-7 週齢の雄の Sprague-Dawley (IGS) ラット (Charles River Laboratories Japan) に投与した。サルを用いた試験では 4 年齢の雄および雌のカニクイザル (Gaoyao Kangda Laboratory Animals Science & Technology Co., Ltd.) を用いて、TAK-137 (10、100 mg/kg) を経口で投与した。薬物投与後 8 時間動物を観察し、それぞれの群において痙攣が観察された動物の割合を算出した。

## 統計解析

化合物の複数用量の作用を評価する試験においては、統計的有意差は one-tailed Williams' test あるいは one-tailed Shirley-Williams test を用いて解析し、P 値  $\leq 0.025$  を有意な差とした。DMTS 試験では、two-way analysis of variance (ANOVA) を用いて解析し、P 値  $\leq 0.05$  を有意な差とした。

## 結論

本研究では、AMPA 受容体 PAM の AMPA 受容体への結合様式とその機能的表現系の関係を考慮した独自のスクリーニング戦略を提唱した（第 1 章）。さらに、化合物スクリーニングにより見出された dihydropyridothiadiazine 2,2-dioxides 誘導体の X 線結晶構造解析による結合様式の解析から、AMPA 受容体の 743 番目のセリンとの立体障害に着目した化合物の最適化が広い用量域で薬効を有し、副作用（痙攣）のリスクを軽減した AMPA 受容体 PAM の創成には重要であることが示唆された（第 2 章）。実際に、dihydropyridothiadiazine 2,2-dioxides 誘導体の最適化研究により見出された TAK-137 は既存の AMPA 受容体 PAM LY451646 よりも広い用量域で認知改善作用等を示し、また、痙攣リスクが低いことがわかった（第 3 章）。

現在、私の研究グループでは本研究の知見に基づき TAK-653 を見出し、現在うつ病を対象に臨床開発中である。本研究で得られた種々の *in vitro* 試験（結合試験、X 線結晶構造解析、初代神経細胞を用いたファンクショナルアッセイなど）を用いた低アゴニスト性 AMPA 受容体 PAM のスクリーニング戦略の知見は AMPA 受容体 PAM の精神疾患および神経変性疾患に対する治療薬としての研究開発の道を開き、薬学領域へ貢献するものと考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切なる御助言と御指導を賜りました九州大学大学院薬学研究院 蛋白質創薬学分野 植田正 教授に心から感謝申し上げます。

本研究を学位請求論文としてまとめるに際し、適切なる御助言と御指導を賜りました九州大学大学院薬学研究院 ライフイノベーション分野 津田誠 教授、九州大学大学院薬学研究院 蛋白質創薬学分野 阿部義人 准教授、九州大学大学院薬学研究院 グローバルヘルスケア分野 Caaveiro Jose 准教授に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えて下さいました、武田薬品工業株式会社 Ceri Davies 博士、平井圭介 博士、木村温英 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究は、武田薬品工業株式会社 木村温英 博士の御指導のもと、田島泰一 氏、久野晴彦 氏、曾我部智 博士、田中麻衣子 氏、鈴木篤 氏、鈴木敬子 氏、鈴木基久 博士、中村信二 博士、横田彰宏 氏、小杉洋平 氏、栗崎泰行 博士、加来智弘 博士の御助言と御援助をいただきながら実施いたしました。心より感謝いたします。

最後に、本研究に協力してくれた武田薬品工業株式会社 リサーチの諸氏に心から感謝します。

## 引用文献

1. Conn, P.J., Lindsley, C.W., Meiler, J. & Niswender, C.M. Opportunities and challenges in the discovery of allosteric modulators of GPCRs for treating CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 692-708 (2014).
2. Sako, Y. et al. TAK-071, a novel M1 positive allosteric modulator with low cooperativity, improves cognitive function in rodents with few cholinergic side effects. *Neuropsychopharmacology* **44**, 950-960 (2019).
3. O'Neill, M.J., Bleakman, D., Zimmerman, D.M. & Nisenbaum, E.S. AMPA receptor potentiators for the treatment of CNS disorders. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 181-94 (2004).
4. Kew, J.N. & Kemp, J.A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* **179**, 4-29 (2005).
5. Boulter, J. et al. Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science* **249**, 1033-7 (1990).
6. Keinänen, K. et al. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* **249**, 556-60 (1990).
7. Nakanishi, N., Shneider, N.A. & Axel, R. A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron* **5**, 569-81 (1990).
8. Fletcher, E.J. et al. Cloning, expression and pharmacological characterization of a human glutamate receptor: hGluR4. *Receptors Channels* **3**, 21-31 (1995).
9. Sommer, B. et al. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* **249**, 1580-5 (1990).
10. Schoft, V.K., Schopoff, S. & Jantsch, M.F. Regulation of glutamate receptor B pre-mRNA splicing by RNA editing. *Nucleic Acids Res* **35**, 3723-32 (2007).
11. Kato, A.S., Siuda, E.R., Nisenbaum, E.S. & Brecht, D.S. AMPA receptor subunit-specific regulation by a distinct family of type II TARPs. *Neuron* **59**, 986-96 (2008).
12. Tomita, S. Regulation of ionotropic glutamate receptors by their auxiliary subunits. *Physiology (Bethesda)* **25**, 41-9 (2010).
13. Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P. & Gouaux, E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* **462**, 745-56 (2009).
14. Derkach, V.A., Oh, M.C., Guire, E.S. & Soderling, T.R. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **8**, 101-13 (2007).
15. Murray, T.K. et al. LY503430, a novel alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor potentiator with functional, neuroprotective and neurotrophic effects in rodent models of Parkinson's disease.

- J Pharmacol Exp Ther* **306**, 752-62 (2003).
16. Balaratnasingam, S. & Janca, A. Brain Derived Neurotrophic Factor: a novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Ther* **134**, 116-24 (2012).
  17. Yamada, K.A. Modulating excitatory synaptic neurotransmission: potential treatment for neurological disease? *Neurobiol Dis* **5**, 67-80 (1998).
  18. Beattie, E.C. et al. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci* **3**, 1291-300 (2000).
  19. Ehlers, M.D. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* **28**, 511-25 (2000).
  20. Bai, F., Bergeron, M. & Nelson, D.L. Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology* **44**, 1013-21 (2003).
  21. Fowler, J.H., Whalley, K., Murray, T., O'Neill M, J. & McCulloch, J. The AMPA receptor potentiator LY404187 increases cerebral glucose utilization and c-fos expression in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**, 1098-109 (2004).
  22. Bernard, K. et al. DRUG FOCUS: S 18986: A positive allosteric modulator of AMPA-type glutamate receptors pharmacological profile of a novel cognitive enhancer. *CNS Neurosci Ther* **16**, e193-212 (2010).
  23. Mackowiak, M., O'Neill, M.J., Hicks, C.A., Bleakman, D. & Skolnick, P. An AMPA receptor potentiator modulates hippocampal expression of BDNF: an in vivo study. *Neuropharmacology* **43**, 1-10 (2002).
  24. Sasaki, T., Kawai, K., Saijo-Kurita, K. & Ohno, T. Detergent cytotoxicity: simplified assay of cytolysis by measuring LDH activity. *Toxicol In Vitro* **6**, 451-7 (1992).
  25. Kessler, M. & Arai, A.C. Use of [3H]fluorowillardiine to study properties of AMPA receptor allosteric modulators. *Brain Res* **1076**, 25-41 (2006).
  26. Ward, S.E., Bax, B.D. & Harries, M. Challenges for and current status of research into positive modulators of AMPA receptors. *Br J Pharmacol* **160**, 181-90 (2010).
  27. Kaae, B.H. et al. Structural proof of a dimeric positive modulator bridging two identical AMPA receptor-binding sites. *Chem Biol* **14**, 1294-303 (2007).
  28. Sukumaran, M. et al. Dynamics and allosteric potential of the AMPA receptor N-terminal domain. *EMBO J* **30**, 972-82 (2011).
  29. Jhee, S.S. et al. Multiple-dose plasma pharmacokinetic and safety study of LY450108 and LY451395 (AMPA receptor potentiators) and their concentration in cerebrospinal fluid in healthy human subjects. *J Clin Pharmacol* **46**, 424-32 (2006).
  30. Gates, M., Ogden, A. & Bleakman, D. Pharmacological effects of AMPA receptor potentiators LY392098 and LY404187 on rat neuronal AMPA receptors in vitro.

- Neuropharmacology* **40**, 984-91 (2001).
31. Miu, P. et al. Novel AMPA receptor potentiators LY392098 and LY404187: effects on recombinant human AMPA receptors in vitro. *Neuropharmacology* **40**, 976-83 (2001).
  32. Yelshanskaya, M.V., Li, M. & Sobolevsky, A.I. Structure of an agonist-bound ionotropic glutamate receptor. *Science* **345**, 1070-4 (2014).
  33. Armstrong, N. & Gouaux, E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* **28**, 165-81 (2000).
  34. Zarrinmayeh, H. et al. [3H]N-2-(4-(N-benzamido)phenyl)propyl-2-propanesulfonamide: a novel AMPA receptor potentiator and radioligand. *J Med Chem* **44**, 302-4 (2001).
  35. Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode *Methods in Enzymology* **276**, 307-326 (1997).
  36. Murshudov, G.N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 355-67 (2011).
  37. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501 (2010).
  38. Chen, V.B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 12-21 (2010).
  39. Traynelis, S.F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* **62**, 405-96 (2010).
  40. Hayashi, Y. et al. A novel, rapid, quantitative cell-counting method reveals oligodendroglial reduction in the frontopolar cortex in major depressive disorder. *Mol Psychiatry* **16**, 1155-8 (2011).
  41. Shiraishi, E., Suzuki, K., Harada, A., Suzuki, N. & Kimura, H. The Phosphodiesterase 10A Selective Inhibitor TAK-063 Improves Cognitive Functions Associated with Schizophrenia in Rodent Models. *J Pharmacol Exp Ther* **356**, 587-95 (2016).

## 公表論文

本論文は学術誌に掲載された下記の論文をまとめたものである。

1. Kunugi A, Tanaka M, Suzuki A, Tajima Y, Suzuki N, Suzuki M, Nakamura S, Kuno H, Yokota A, Sogabe S, Kosugi Y, Awasaki Y, Kaku T, Kimura H (2019) TAK-137, an AMPA-R potentiator with little agonistic effect, has a wide therapeutic window. *Neuropsychopharmacology*. 44(5):961-970.
2. Kunugi A, Tajima Y, Kuno H, Sogabe S, Kimura H (2018) HBT1, a Novel AMPA Receptor Potentiator with Lower Agonistic Effect, Avoided Bell-Shaped Response in *In Vitro* BDNF Production. *J Pharmacol Exp Ther*. 364(3):377-389.