

博士論文

ニューロメジンU受容体をターゲットとした抗肥満薬開発
における薬理学的研究

The pharmacological studies on development of an anti-obesity
drug targeting neuromedin U receptor

株式会社 スコヒアファーマ

改正 知子

平成30年度

目次

略語一覧	4
第1章 序章	8
第1-1節 肥満症と肥満症治療薬の現状	8
第1-2節 ニューロメジンUおよび受容体	14
第2章 新規抗肥満薬の研究開発に向けて最適な標的受容体を選定するための薬理学的研究	18
第2-1節 序論	18
第2-2節 結果	21
2-2-1. ペプチド構造および細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用	21
2-2-2. DIO マウスを用いた2週間反復投与試験による薬効比較	22
2-2-3. 正常マウスにおける消化管ホルモン分泌に対する作用	25
2-2-4. NMUR1 および NMUR2 選択的作動薬による視床下部における c-Fos 発現	27
2-2-5. 血中コルチコステロン変化	30
第2-3節 考察	30
第2-4節 結論	34
第3章 ニューロメジンU受容体2選択的作動薬の薬理学的研究	35
第3-1節 序論	35
第3-2節 結果	36
3-2-1. ペプチド構造および細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用	36
3-2-2. DIO-C57BL/6J マウスにおける NMU-7005 の4週間反復投与の抗肥満効果	37
3-2-3. DIO マウスにおける NMU-7005 の薬物動態パラメーター	39
3-2-4. NMUR2 KO マウスにおける摂食および体重に対する NMU-7005 およびリラグルチドの単回投与の影響	40
3-2-5. NMU-7005 の条件付け味覚嫌悪 (CTA)への影響	42
3-2-6. DIO マウスを用いたリラグルチドとの共投与あるいは非共投与における NMU-7005 の2週間反復投与の摂食抑制効果の検討	43
3-2-7. 末梢投与された NMU-7005 の視床下部および延髄における c-Fos 様免疫反応性に対する影響	45
第3-3節 考察	47
第3-4節 結論	52
第4章 結語	53
第5章 実験の部	55

第5-1節 第2章の実験	55
5-1-1. 動物および飼料	55
5-1-2. ペプチド	55
5-1-3. NMUR1 あるいは NMUR2 を安定的発現させたチャイニーズハムスター卵巣細胞株を用いた受容体結合アッセイ	56
5-1-4. NMUR1 あるいは NMUR2 を安定的発現させた CHO 細胞株を用いた細胞内 Ca ²⁺ 濃度アッセイ	57
5-1-5. 血中指標の測定	57
5-1-6. DIO マウスを用いた 2 週間反復投与試験	58
5-1-7. 薬物動態	58
5-1-8. c-Fos 免疫組織化学	59
5-1-9. Pomc に対する <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション (ISH)	60
5-1-10. 神経解剖学的定量分析	60
5-1-11. C57BL/6J マウスを用いたホルモン分泌へ及ぼす作用	61
5-1-12. マウスを用いた血漿コルチコステロン測定	61
5-1-13. 統計	62
第5-2節 第3章の実験	62
5-2-1. ペプチドおよび材料	62
5-2-2. NMUR1 あるいは NMUR2 を安定的発現させた CHO 株を用いた細胞内 Ca ²⁺ 濃度アッセイ	62
5-2-3. 動物および飼料	63
5-2-4. 薬物動態	63
5-2-5. 雄性 DIO-C57BL/6J マウスにおける NMUR2 選択的作動薬 NMU-7005 の 4 週間の反復投与	64
5-2-6. 血漿パラメーター測定	64
5-2-7. NMUR2 KO マウスにおける摂食および体重に対する NMU-7005 およびリラグルチドの単回投与の影響	65
5-2-8. 条件付け味覚嫌悪 (CTA) 試験	65
5-2-9. DIO マウスを用いたリラグルチドとの共投与あるいは非共投与における NMU-7005 の 2 週間反復投与の摂食抑制効果の検討	66
5-2-10. 視床下部および延髄における c-Fos 免疫反応に対する末梢 NMU-7005 投与の影響	66
5-2-11. 統計	67
謝辞	68
透明性と科学的厳密さの宣言	69
引用論文	70

略語一覧

用語	定義
AgRP	Agouti-related protein アグーチ関連ペプチド
ALT	Alanine aminotransferase アラニンアミノトランスフェラーゼ
ANOVA	Analysis of variance 分散分析
AST	Aspartate aminotransferase アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AP	Area postrema 最後野
ARC	Arcuate nucleus 弓状核
AUC _{0-24h}	Area under the curve during 24 hours 時間ゼロから 24 時間までの血漿中濃度時間曲線下面積
BMI	Body mass index ボディ・マス・インデックス
CART	Cocaine- and amphetamine-regulated transcript アンフェタミン調節転写産物
CCK	Cholecystokinin コレシストキニン
CHO	Chinese hamster ovary チャイニーズハムスター卵巣
C _{max}	Maximum drug concentration 最高血漿中濃度
CNS	Central nervous system 中枢神経系
CRH	Corticotropine-releasing hormone コルチコトロピン放出ホルモン
CTA	Conditioned taste aversion 条件付け味覚嫌悪
DIO	Diet-induced obesity 食餌誘発性肥満

DMN	Dorsomedial nuclei 背内側核
EC ₅₀	Half maximal effective concentration 50%有効濃度
FBS	Fetal bovine serum 牛胎児血清
FDA	Food and Drug Administration 米国食品医薬品局
FLIPR	Fluorometric imaging plate leader 蛍光イメージングプレートリーダー
GABA	Gamma Amino Butyric Acid γ-アミノ酪酸
HDL	High density lipoprotein 高比重リポタンパク質
HFD	High fat diet 高脂肪食
HPA	Hypothalamus-pituitary-adrenocortical 視床下部-下垂体-副腎皮質
HSA	Human serum albumin ヒト血清アルブミン
ISH	<i>in situ</i> hybridization <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション
GHb	Glycated hemoglobin グリコヘモグロビン
GLP-1	Glucagon-like peptide-1 グルカゴン様ペプチド-1
Glu	Glucose グルコース
IRI	Immuno-reactive insulin 免疫反応性インスリン
KO	Knockout ノックアウト
LDL	Low density lipoprotein 低比重リポタンパク質
LHA	Lateral hypothalamic area (lateral nuclei) 外側野 (外側核)

α -MSH	α -Melanocyte-stimulating hormone α -メラノサイト刺激ホルモン
MRT	Mean residence time 平均滞留時間
NMU	Neuromedin U ニューロメジン U
NMUR1	Neuromedin U receptor 1 ニューロメジン U 受容体 1
NMUR2	Neuromedin U receptor 2 ニューロメジン U 受容体 2
NMS	Neuromedin S ニューロメジン S
NPY	Neuropeptide Y 神経ペプチド Y
OXM	Oxyntomodulin オキシントモジュリン
PBS	Phosphate buffered saline リン酸緩衝生理食塩水
PEG	Polyethylene glycol ポリエチレングリコール
POMC	Proopiomelanocortin プロピオメラノコルチン
PVN	Paraventricular nucleus 室傍核
PYY	Peptide YY ペプチド YY
SD	Standard deviation 標準偏差
T _{1/2z}	Terminal elimination half-life 消失半減期
T-Cho	Total cholesterol 総コレステロール
Tg	Transgenic トランスジェニック
TG	Triglyceride トリグリセリド

T_{\max}	Time to reach C_{\max} 最高血漿中濃度に達するまでの時間
VMN	Ventromedial nuclei 腹内側核
WHO	World Health Organization 世界保健機関
Y2R	Neuropeptide Y receptor 2 ニューロペプチド Y 受容体 2

第1章 序章

第1-1節 肥満症と肥満症治療薬の現状

肥満はエネルギー摂取とエネルギー消費の長期にわたる不均衡に起因する慢性複合疾患であり、健康にリスクをもたらす異常あるいは過剰の脂肪蓄積と定義されている。最も一般的な指標の一つは、体重 (kg) を身長 (m) の2乗で割った相対値：ボディ・マス・インデックス (BMI) = (kg)/(m)² で、世界保健機関 (WHO) では、成人の場合、BMI が 25.0 kg/m² 以上であれば過体重、BMI が 30 kg/m² 以上であれば肥満と分類する(1)。WHO は、世界の肥満率が 1975 年以来ほぼ 3 倍に増加していると推定しており、2016 年の肥満成人(18 歳以上) 数は 6.5 億人、過体重の成人数は 19 億人である。肥満は 2 型糖尿病、高血圧、脂質異常症、心血管系疾患、ある種のガン、非アルコール性脂肪肝、腎疾患などの共存疾患を生じ、その結果死亡率が増加する。また BMI が高くなるほど、2 型糖尿病、高血圧、心血管系疾患および死亡率が高くなることが報告されている(表 1) (2, 3)。

表 1. BMI および関連疾患リスク*による体重増加および肥満の分類および死亡率

BMI	クラス	罹患率 (病気のリスク)	死亡率 (ハザード比)
<18.5	痩せ		
18.5-24.9	正常		
25.9-29.9	過体重	増加 / 高	0.94
30.0-34.9	肥満	I 高 / かなり高い	0.95
35.0-39.9		II かなり高い	1.29
≥40	極度肥満	III 極度に高い	

*関連疾患リスク, 2 型糖尿病、高血圧、心血管疾患

引用論文(2, 3)より改変

このような背景から肥満症は費用の面で公衆衛生上の問題となっており(4-6)、肥満治療はこれらの疾患の予防にも有用である。薬物療法の方針としては、まず食事療法や運動療法を12週間程度行い、改善が認められない場合に補助療法として行われる(7)。従来、多くの肥満症治療薬が開発されたが、過去にはリモナバンおよびシブトラミンなどの薬剤が、米国および欧州で心血管系あるいは中枢性の懸念により却下および/あるいは保留された経緯がある。現在、アメリカ食品医薬品局(FDA)で承認されている肥満症治療薬は以下の5薬剤、すなわち吸収抑制剤のオルリスタット(Alli®及び Xenical®)、中枢作動性食欲抑制薬のロルカセリン(Belviq®)、フェンテルミン/トピラマート(Qsymia®)、ナルトレキソン/ブプロピオン(Contrave®)およびグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)受容体作動薬であるリラグルチド(Saxenda®)である(表2)(8)が、これらの薬剤では12ヶ月間の治療で10%未満の体重減少と、その有効性は限られていることに加えて安全性に対する懸念がある。日本で保険収載されている肥満症治療薬はマジンドール(サノレックス®)の1剤であるが、その保険適用診療は重度肥満患者(BMI $\geq 35 \text{ kg/m}^2$)に制限され、最長投与期間は3ヵ月である(9)。

今日までに最も有効な重度肥満の治療法は肥満外科手術であり、BMIが40以上、あるいは35以上で肥満関連共存疾患を有する患者に適用されている(10)。特にRoux-en-Y胃切除術では、年齢を一致させた対照患者と比較して、2年後の追跡時点で平均体重減少率が20%、20年後の追跡時点では15%を超えることが示され、これらの体重減少とともに2型糖尿病の寛解およびその他の心血管系疾患の危険因子の軽減など、肥満関連共存疾患の改善が認められ死亡率も低下した。今日までに、死亡率の低下を示したのは肥満外科手術のみであることから、死亡率の低下と15%を超える平均体重減少率の10年間の維持との関連性が示唆されている(11)。ただし、肥満外科手術にはそれに伴うリスクがあり、肥満患者

の全てが減量手術の候補とされるわけではない。このように、現状では十分な薬効と安全性を兼ね備えた薬剤は得られておらず、肥満症は高いアンメットニーズを有している。

表 2. 2018 年 4 月現在 FDA に認可されている肥満症治療薬

一般名	ブランド名	作用機序	用量	脂質プロファイルに対する影響	体重減少量 (およそ) kg	主な副作用
オルリスタット	Xenical, Ali	リパーゼインヒビター	120 mg	↓ LDL ↓ T-Cho ↓ TG	5.6-6.7	脂肪便、 鼓腸
ロルカセリン	Belviq	セロトニンアゴニスト (5-HT _{2c} 受容体アゴニスト)	10 mg	↓ T-Cho ↓ TG ↔ LDL ↔ HDL	5.8 ± 0.2	頭痛、めまい、 悪心
フェンテルミン/ トピラメート	Qsymia	中枢でのノルアドレナリン、ドーパミン、 セロトニン放出促進作用 + GABAA受容体機能増強作用	3.75/23 mg 7.5/46 mg	↓ T-Cho ↓ LDL ↓ TG ↑ HDL	8.1-10.2	口腔内乾燥、 知覚障害、 便秘、 不眠、めまい
ナルトレキソン/ ブプロピオン	Contrave	オピオイド受容体アンタゴニスト ドーパミン再取り込み阻害作用	32/260 mg	↓ T-Cho ↓ LDL ↓ TG ↑ HDL	9.3	悪心、頭痛、 便秘、 めまい、嘔吐、 口腔内乾燥
リラグルチド	Saxenda	グルカゴン様ペプチド-1受容体アゴニスト 3 mg		↓ T-Cho ↓ LDL ↓ TG ↑ HDL	8.4 ± 7.3	悪心、 低血糖、 下痢、 便秘、 嘔吐

FDA, アメリカ食品医薬局、HDL, 高比重リポタンパク質、LDL, 低比重リポタンパク質、T-Cho, 総コレステロール、TG, トリグリセリド 参考文献(8)より

低分子化合物と比較してペプチド医薬品が標的受容体に対して高い特異性を有すること(12)から、肥満症治療薬として非常に有効であり魅力的であると考えられている。腸管ホルモンペプチドは有効性が高く安全であることが期待されるため、肥満症治療のための新たな薬物標的として注目されており(13)、また肥満外科手術で得られる減量および代謝疾患の改善効果には、エネルギーおよび

グルコース調節に関与する多くの腸管ホルモンの変動が関わっていることが分かってきている(14)。このため、食欲および/または代謝を調節する神経経路は新規肥満症治療薬の魅力的な標的であり、これまでに摂食抑制作用を有する生理活性ペプチドである GLP-1、アミリン、ペプチド YY (PYY)、レプチンやそれらの誘導体、オキシントモジュリン (OXM)を含むデュアル GLP-1/グルカゴン受容体作動薬は、抗肥満薬として臨床試験が行われている(15)。上述のように、リラグルチドは 2 型糖尿病治療薬として使用されているが、持続的な体重減少を伴う肥満症治療薬として承認されている(8, 16)。

弓状核 (ARC)は腸管ホルモン、エネルギー恒常性シグナルを統合する上で重要であり、2つの神経細胞集団、すなわち摂食亢進に関わる神経ペプチド Y(NPY)/アグーチ関連ペプチド(AgRP)ニューロンおよび食欲抑制に関わるプロピオメラノコルチン(POMC) / アンフェタミン調節転写産物(CART)ニューロンが存在することが知られている。NPY/AgRP ニューロンおよび POMC/CART ニューロンは、室傍核(PVN)および他の視床下部核に投射して食欲を増減する。室傍核は弓状核ニューロンの重要な標的組織であると考えられており、より高次中枢および交感神経系にシグナルを送り甲状腺の軸を調節する (図 1) (17, 18)。

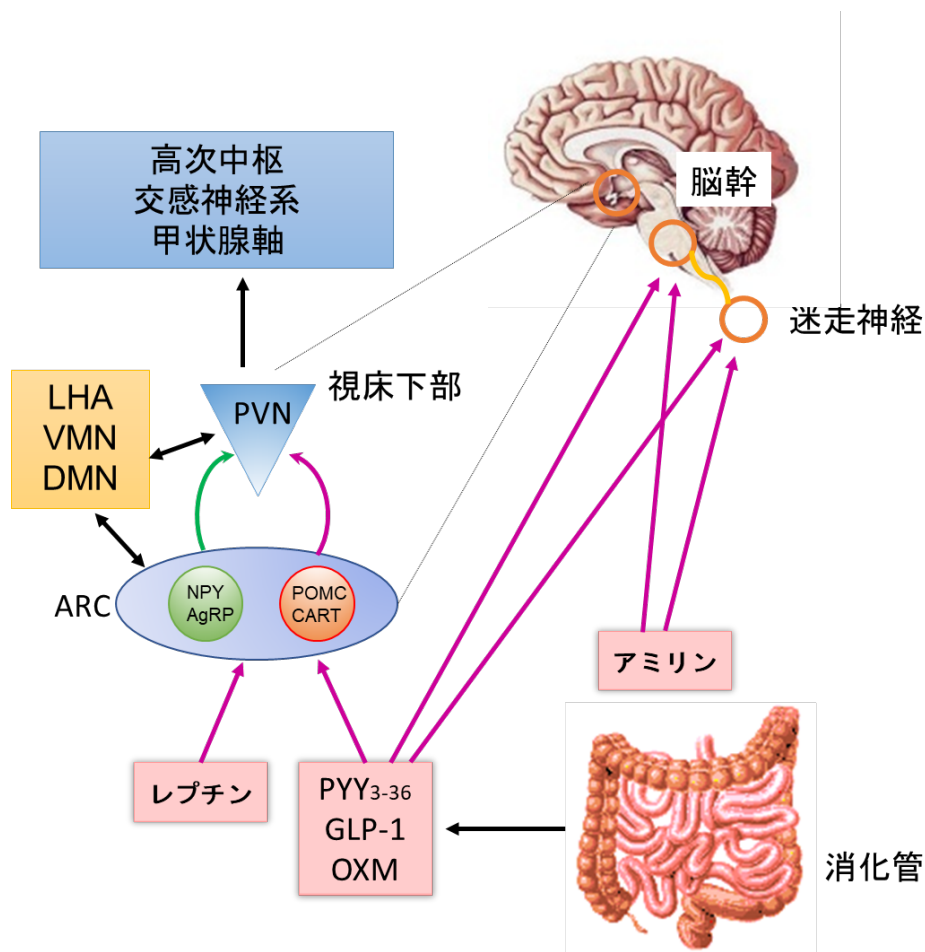


図 1. 食欲抑制ホルモンの中枢作用

PYY₃₋₃₆、GLP-1 および OXM は食後に腸管 L 細胞から放出され、視床下部および脳幹を直接刺激、あるいは迷走神経を介して作用する。レプチンは全身の脂肪細胞で作られ、視床下部 NPY / AgRP ニューロンを抑制する。アミリンはインスリンとともに膵β細胞より放出され、迷走神経あるいは血流を介して摂食を抑制する。摂食亢進を緑色、摂食抑制を紫色の矢印で示した。PYY, ペプチド YY、OXM, オキシントモジュリン、PVN, 室傍核、LHA, 外側野、VMN, 腹内側核、DMN, 背内側核、NPY, 神経ペプチド Y、AgRP, アグーチ関連ペプチド、POMC, プロピオメラノコルチン、CART, アンフェタミン調節転写産物

引用論文(17, 18)より改変

栄養素およびホルモンによって伝達されるエネルギー情報は、神経および体液性の 2 つの経路を介して統合され、神経経路は消化管および肝門脈を支配する迷走神経求心性神経を介して末梢エネルギー状態を感知する。迷走神経求心性神経は、栄養学的情報を脳幹の孤束、続いて視床下部に伝達し、体液性伝達は

弓状核へ栄養素およびホルモン情報を直接入力する。このように、視床下部と脳幹の間には広範な相互接続があり、エネルギー摂取量は視床下部と脳幹で受信した情報に基づいて調節されている。視床下部 POMC/CART ニューロンの活性化は、プロセッシングにより POMC から産生される α -メラノサイト刺激ホルモン (α -MSH) を介して興奮性に、NPY/AgRP ニューロンは NPY、AgRP、 γ -アミノ酪酸(GABA) を介して抑制的にメラノコルチン 4 型受容体を介して摂食を制御する。脳幹においては、孤束核、最後野および背側運動核はすべてエネルギー恒常性の調節に関与している (図 2) (19)。

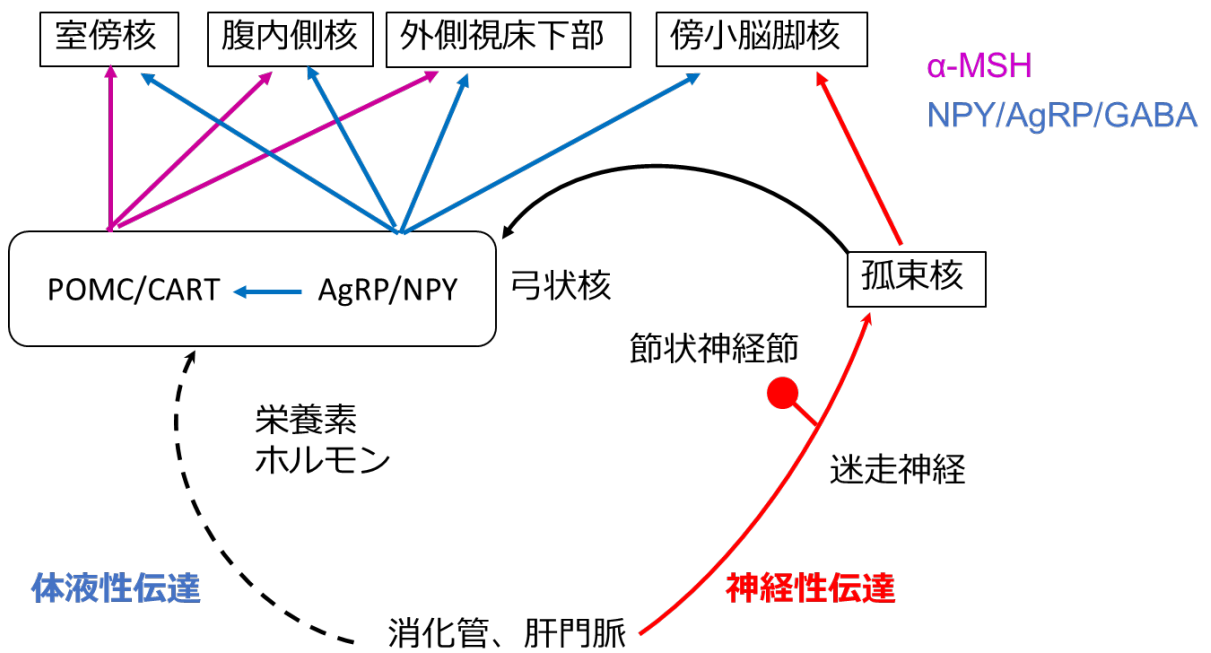


図 2. 恒常的食欲制御のための回路

α -MSH, α -メラノサイト刺激ホルモン、GABA, γ -アミノ酪酸 引用論文(19)より改変

第1-2節 ニューロメジンUおよび受容体

ニューロメジン U (NMU) は、摂食抑制およびエネルギー代謝亢進による抗肥満作用を有することから抗肥満薬の新規ターゲットとして注目されている。NMU は 1985 年に国立循環器病研究センターの南野博士らによってブタの脊髄から最初に単離された神経ペプチドで、発見当初ラットの子宮平滑筋収縮を亢進させる能力があることから命名された(20, 21)。NMU はほぼ全ての脊椎動物に見出されており、脳、脊髄などの中枢組織のみならず消化管など末梢組織にも存在することが報告されている(22-24)。血漿中 NMU-25-様免疫活性濃度はラットにおいては < 0.5 pM と検出できない(25)、あるいはヒトで 3.66 ± 0.73 pM と極めて低い(26)ため、NMU は循環ホルモンではなくオートクラインあるいはパラクラインにより局所に作用すると考えられている(27)。NMU は摂食行動の調節以外にエネルギー恒常性の制御、侵害知覚、ストレス反応、炎症、骨形成、概日リズム調節、血管機能調節、消化管機能調節、膵 β 細胞からのインスリン分泌抑制、免疫など様々な生体機能制御に関与することが報告されている(22, 23, 27-33)。NMU には、同様の生理活性を有する3つのペプチド（ヒト、ブタ、イヌでは25アミノ酸からなる NMU-25、マウス、ラットでは23アミノ酸からなる NMU-23、さらにブタ、イヌでは8アミノ酸からなる NMU-8）が同定されており(22, 23)、NMU-8 はペプチダーゼ切断によって NMU-25 から産生される。C末端の7アミノ酸配列は脊椎動物で完全に保存されていることから、これらは進化上も機能的に重要であったと考えられている（図2）(22, 23)。これらのペプチドはヒト、ラットでは174アミノ酸から構成されており、34アミノ酸からなるシグナルペプチドを有する前駆体タンパク質から生成され、未知のプロテアーゼによって切断される(26, 27)が、産生細胞は明確ではない。

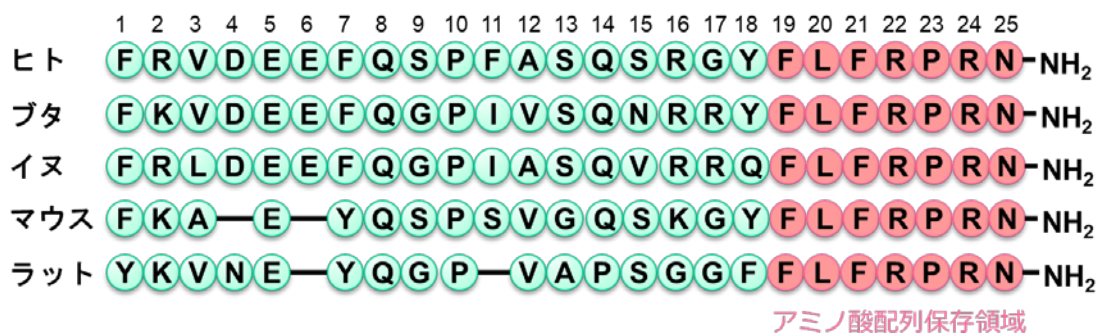


図 2. NMU-25 あるいは NMU-23 のアミノ酸配列

マウス、ラットは相同性を示すためにギャップを挿入した。

重要な点として、ヒトにおける NMU 遺伝子の突然変異が肥満と関連していることが報告されている(34)。NMU をラットに脳室内投与すると摂食が抑制され、エネルギー代謝が増強し(35, 36)、NMU トランスジェニック(Tg)マウスは摂食量が低下しグルコースホメオスタシスを改善させ、痩せのフェノタイプを示す(37)、が対照的に、NMU ノックアウト(KO)マウスは摂食量が増加し、自発運動および基礎代謝の低下を伴う肥満を呈し、体脂肪蓄積、耐糖能異常や脂質異常を呈する(38)。NMU KO マウスでは、脳内において摂食抑制を引き起こす POMC やコルチコトロピン放出ホルモン(CRH)の発現低下が見られており、NMU の下流に POMC や CRH が存在していることが示唆されている(38)。実際に、中枢への NMU 投与により視床下部-下垂体-副腎皮質(HPA)系が活性化されること(39)や、CRH KO マウスでは NMU の中枢投与による摂食抑制作用および代謝亢進作用が見られないこと(40)が報告されている。また、ラット脳で同定された NMU と C 末端の 7 アミノ酸配列が共通であるニューロメジン S (NMS) は、視床下部、腎臓、精巣に発現が認められており概日リズム調節への関与が示唆されている(41)。NMS の脳室内投与も NMU と同様に摂食抑制作用を有することが報告されている(42)。

NMU および NMS に対して高親和性を示す受容体として、2 つの異なる受容体、すなわち NMU 受容体 1(NMUR1、あるいは GPR66、FM-3)および 2(NMUR2、あるいは TGR-1、FM-4)が同定されている。NMUR1 および NMUR2 はオーファンクラス A の 7 回膜貫通型の G タンパク質共役受容体として 2000 年に見出され(35, 43-49)、これらの遺伝子はヒト 2 番と 5 番染色体にそれぞれ局在しており、Gq/11 および G α i と共役し(50)、ホスホリパーゼ C の活性化を介して細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させる。ヒトでは NMUR1 は主に腸、精巣、膵臓、子宮、肺、胃および腎臓などの広範囲の末梢組織で発現しており、NMUR2 は主に中枢神経系(CNS)の視床下部の弓状核および室傍核に発現しているが、末梢組織でも精巣、腎、肺に発現が認められる(46)。NMU は C 末端の保存された 7 アミノ酸配列を介してこれらの受容体と相互作用する(35, 46, 49, 51)。これまでの研究では、NMUR1 は摂食抑制、弛緩作用、胃酸分泌抑制、胃滞留遅延促進、膵 β 細胞からのインスリン分泌抑制、炎症、免疫反応の亢進に関与し、NMUR2 は摂食抑制、エネルギー消費亢進、侵害知覚、ストレス反応、骨形成低下および体内リズム調節に関与する。摂食に関する作用としては、脳室内投与された NMU は NMUR1 ではなく NMUR2 を介して作用する(52)が、NMU の末梢投与は NMUR1 を介して摂食量および体重を減少させる(53)ことが報告されているものの、NMU の摂食抑制作用に対するメカニズムはいまのところ不明である。これまでに、パルミテート結合型 NMU の末梢投与は第 1 回目の投与後は摂食量の低下を示し、これは一部胃排泄遅延が関与していることが報告されている(54)。NMU の単回脳室内投与による摂食抑制には上記のように HPA 系の活性が一部関与しており、HPA 系の活性化によって生じる自発運動活性を伴うグルーミング行動は NMUR2 KO マウスでは見られなかった(52)。しかし、パルミテート結合型 NMU の 7 日間反復末梢投与では摂食量の低下は見られなくなり、NMU の慢性脳室内

投与では、摂食量および体重低下が見られたものの、自発運動活性およびコルチコステロン濃度に変化が見られなかった。

これらの薬理的解析およびヒト、マウスの遺伝学的解析から、NMU が摂食抑制およびエネルギー代謝亢進による抗肥満作用を有する、すなわち 1) NMU Tg マウスは 摂食抑制および痩せのフェノタイプを示す、 2) NMUKO マウスは摂食亢進、体重増加および体脂肪蓄積を示す、3) ヒトにおける NMU 遺伝子突然変異は肥満を引き起こすことが、抗肥満薬の新規ターゲットとする理論的根拠になりえると考え、NMU 受容体をターゲットとした新規抗肥満薬の研究開発に着手した。上記のように NMU の摂食抑制作用を介した抗肥満作用には、両方の受容体が寄与することが知られているが、薬効および有害事象に関して、NMUR1/R2 非選択的作動薬、NMUR1 あるいは R2 選択的作動薬のうちどれが抗肥満薬の新薬開発を考える上で最適であるのかは不明であった。

そこで本研究ではまず、第 2 章で新規抗肥満薬の研究開発に向けて最適な標的受容体を選定するための薬理学的研究として、新たに同定した NMUR1/R2 非選択的作動薬である NMU-0002 および NMU-6014、NMUR1 選択的作動薬である NMU-6102、および NMUR2 選択的作動薬である NMU-2084 をツール化合物として用いて、食餌性肥満(DIO)モデルマウスにおける薬効および副作用を比較検討した。次に、第 3 章では第 2 章で選定した標的受容体に対する新規ペプチド性作動薬である NMU-7005 を抗肥満薬の開発候補化合物として同定し、薬理学的検討を行った。

第2章 新規抗肥満薬の研究開発に向けて最適な標的受容体を選定するための薬理学的研究

第2-1節 序論

第1章で前述したように、これまでに NMU の脳室内投与はげっ歯類の摂食量および体重を減少させ(35, 36, 45)、同時に自発運動量および体温を低下させること(36)、NMU の末梢投与もまたげっ歯類において NMUR1 を介して摂食量および体重を減少させることが報告されている(53)。一方、その発現パターンによって示唆されるように、NMUR2 は NMU による CNS を介した摂食行動の調節において重要な役割を果たすと考えられている。NMUR2 KO マウスの体重は、通常飼料を与えた場合は野生型マウスの体重と差は見られなかった(52, 55)が、脳室内投与された NMU は、NMUR1 ではなく NMUR2 を介して作用する(52)。また、ラットの室傍核における NMUR2 のノックダウンが高脂肪食(HFD)を与えられた場合に摂食量および体重増加を示したことから(56)、NMUR2 は室傍核において摂食および体重の調節に重要な役割を果たすことが示唆されている。一方で、末梢投与された NMU はどのような作用機序で中枢を活性化するのかについてはこれまでに報告がほとんどなく、末梢投与した NMU が室傍核および食物に対するモチベーションを調節する背側縫線核の c-Fos レベルを低下させるという報告が1報あるのみである(57)。NMU、NMUR1 および R2 の機能解明の進歩にもかかわらず、肥満症治療に対して最適な作動薬は NMUR1/R2 非選択的、または NMUR1 あるいは NMUR2 選択的作動薬のいずれのタイプであるのかということは依然として不明であった。NMU の血中消失半減期は $T_{1/2z} = 5$ 分以内と非常に短く(53)、肥満症治療薬とするためには血中での代謝安定性を高めることが必須である。さらにペプチド性肥満症/糖尿病治療薬、例えば GLP-1 受容体作動薬のトレンドは1日1回製剤から週1回製剤へと移行してきている。そのた

め、最近になってポリエチレングリコール(PEG)(58)、ヒト血清アルブミン(HSA)(59)またはパルミテート(60)を結合させたプロテアーゼ耐性を持つ $T_{1/2z}$ の長い長時間作用型の NMU 類似体が開発された。種によって異なるが、マウスにおいては PEG-NMU、HSA-NMU、パルミテート化 NMU の $T_{1/2z}$ はそれぞれ、25 (皮下投与)、11 (静脈投与)、24 あるいは 28.2 (静脈投与) 時間であり、パルミテート化 NMU は週 1 回製剤としての投与計画を想定している。PEG-NMU および HSA-NMU を末梢投与すると、Peier らの報告(41)とは異なり、NMUR1 および NMUR2 の両方を介して薬効を発揮したことから、長時間作用型 NMU 類似体と短時間作用型のネイティブ NMU とは異なる作用機序を介して食欲抑制作用を発揮する可能性がある(58, 59)。より最近では、NMUR1 および NMUR2 に対して選択的なヘキサペプチドが同定された(61, 62)が、これらは短時間作用型で *in vivo* 効果は調べられていない。さらに、長時間作用型 NMU 類似体の有害事象は不明である。

従って、本章では血中安定性に優れた NMU 受容体作動薬を創製し、NMUR1/R2 非選択的作動薬、NMUR1 あるいは NMUR2 選択的作動薬の薬理学的作用および有害事象を比較検討し、抗肥満薬に最適な作動薬のタイプを明らかにすることを研究目的とした。

両受容体のアミノ酸配列の相同性は全長で 40%、細胞外領域も N 末端から第 1、2、3 および 4 番目のドメイン間でそれぞれ 16、75、27、26%と低いため、アミノ酸置換で選択性を出せることが予想された。ブタで同定された NMU-8 はヒトにおける存在は報告されていないが、NMU-25 と NMU-8 の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用および ^{125}I -ヒト NMU-25 に対する結合阻害活性に大きな差は認められず、NMU-8 もフルアゴニストとして働くことが確認できたため (表 3)、NMU-8 のアミノ酸配列を基に網羅的アミノ酸置換を行った。その結果、NMUR1 選択性に

は 20 および 21 位のアミノ酸が、NMUR2 選択性には 18, 19 および 23 または 24 位のアミノ酸が重要であることが分かった。NMUR1 および NMUR2 選択性に関して、我々の得た知見と同等の結果を示した公表特許を表 3 に記載する（化合物 A-E、I-N）(63)。NMUR1 選択性に有効なアミノ酸置換としては、D-Ala²⁰、Gly²⁰、Ile²⁰、Trp²¹ の 2 アミノ酸置換、NMUR2 選択性に有効なアミノ酸置換としては、Phe¹⁸、Trp¹⁸、Trp¹⁹、Ala¹⁹、Ala²³、H-Arg²⁴ の 3 アミノ酸置換が挙げられ、細胞内 Ca²⁺濃度上昇作用は NMU-8 と比較してほぼ同等のペプチドが得られることが分かった。

表 3. 非選択的および NMUR1/R2 選択的作動薬のアミノ酸置換

アゴニスト									細胞内Ca ²⁺ 上昇作用		125I-hNMU-25結合阻害活性	
									EC ₅₀ (nM)		IC ₅₀ (nM)	
	AA18	AA19	AA20	AA21	AA22	AA23	AA24	AA25	NMUR1	NMUR2	NMUR1	NMUR2
天然型リガンド												
NMU-25	Tyr	Phe	Leu	Phe	Arg	Pro	Arg	Asn	5.5	1.5	0.47	0.19
NMU8	Tyr	Phe	Leu	Phe	Arg	Pro	Arg	Asn	1.4	2.9	2.4	0.3
NMUR1選択的アゴニスト												
D	Thr	Phe	D-Ala	Trp	Arg	Pro	Arg	Asn	1.5	>1000	3	>1000
C	Thr	Phe	Gly	Trp	Arg	Pro	Arg	Asn	1.1	>1000	0.42	>1000
B	Thr	Phe	Ile	Trp	Arg	Pro	Arg	Asn	9.0	>1000	14	>1000
A	Thr	Phe	-	Trp	Arg	Pro	Arg	Asn	3	>1000	10	>1000
E	Thr	Phe	Ile	Trp	Arg	Pro	Arg	Asn	2	>1000	75	>1000
NMUR2選択的アゴニスト												
L	Phe	Trp	Leu	Phe	Arg	Ala	Arg	Asn	>1000	6.2	>1000	37
J	Phe	Trp	Leu	Phe	Arg	Ala	H-arg	Asn	>1000	160	>1000	150
I	Phe	Trp	Leu	Phe	Arg	Pro	H-arg	Asn	>1000	10	>1000	9.1
K	Trp	Phe	Leu	Phe	Arg	Ala	Arg	dNle	400 ¹⁾	2.0	>1000	13
M	Trp	Ala	Leu	Phe	Arg	Ala	Arg	Asn	>1000	33	>1000	180
N	Phe	Ala	Leu	Phe	Arg	Pro	Arg	Asn	53	3.9	>1000	22

¹⁾ partial agonist 引用論文(63)より改変

ラット NMU-23 および NMS がマウスで有意に摂食量を低下させた一方でブタ NMU-8 は摂食量に影響を与えず、その理由としてはプロテアーゼによる速やかな分解と腎排泄が考えられた。血中動態改善を目的とした修飾

基の検討を行った結果、同定された NMUR1/R2 非選択的作動薬である PEG 化体 NMU-0002(64) 、およびステアシル化体 NMU-6014、NMUR1 選択的作動薬であるパルミチル化体 NMU-6102 および NMUR2 選択的作動薬である PEG 化体 NMU-2084(65)をツール化合物として、DIO マウスにおける薬効薬理作用（摂食抑制および体重低下作用）と副作用に関して比較検討して標的受容体の選定を行い、さらにこれらの作動薬の CNS および腸管ホルモンの作用機序に考察を加えた。

キーワード：摂食抑制、抗肥満、NMU、NMUR1、NMUR2、非選択的作動薬、選択的作動薬

第 2 - 2 節 結果

2-2-1. ペプチド構造および細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用

同定された NMUR1/R2 非選択的および NMUR1 あるいは R2 選択的作動薬のツール化合物のプロファイルを表 4 に示した。NMUR1/R2 非選択的作動薬は PEG 化したオクタペプチド(NMU-0002 と命名)およびステアシル化したノナペプチド(NMU-6014 と命名)、NMUR1 選択的作動薬は 20 および 21 位のアミノ酸を D-アラニンとトリプトファンに置換し、パルミチル化したノナペプチド(NMU-6102 と命名)、NMUR2 選択的作動薬は 18、19 および 23 位のアミノ酸をそれぞれフェニルアラニン、トリプトファン、アラニンに置換、PEG 化したオクタペプチド(NMU-2084 と命名)である。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用は、いずれのペプチドも NMU-8 よりも 10 から 100 倍程度減弱した。

表 4. 非選択的および NMUR1/R2 選択的作動薬のプロファイル

アゴニスト	構造	細胞内Ca ²⁺ 上昇作用		細胞内Ca ²⁺ 上昇作用	
		EC ₅₀ (nM)		EC ₅₀ (nM)	
		hNMUR1	hNMUR2	mNMUR1	mNMUR2
非選択的アゴニスト					
Native NMU8	Tyr-Phe-Leu-Phe-Arg-Pro-Arg-Asn-NH ₂	0.45	0.43	0.81	0.43
NMU-0002	PEG20k-PipAc-Tyr-Phe-Leu-Phe-Arg-Pro-Arg-Asn-NH ₂	8.3	39	23	9.0
NMU-6014	Stearyl-Ape-Gly-Tyr-Phe-Leu-Phe-Arg-Pro-Arg-Asn-NH ₂	53	44	61	45
NMUR1選択的アゴニスト					
NMU-6102	Palmityl-Ape-Gly-Tyr-Phe-D-Ala-Trp-Arg-Pro-Arg-Asn-NH ₂	48	> 1000	91	> 1000
NMUR2選択的アゴニスト					
NMU-2084	PEG20k-PipAc-Phe-Trp-Leu-Phe-Arg-Ala-Arg-Asn-NH ₂	> 880	41	> 880	31

NMU 受容体アゴニストの化学構造および *in vitro* EC₅₀ 値(nM)を示す。h,ヒト; m,マウス; PEG20k,ポリエチレングリコール, 分子量 20kDa; PipAc, 2-(ピペラジン-1-イル)-酢酸; Ape, δ-アミノ吉草酸

マウスにおける薬物動態パラメーターを表 5 に示すが、いずれの化合物も良好な血中安定性を示し、NMU-6014 および NMU-6102 の血中暴露量は NMU-0002 よりも約 2 倍低かった。

表 5. NMUR1/R2 非選択的および選択的作動薬の薬物動態パラメーター

	R1/R2		R1	R2
	NMU-0002*	NMU-6014	NMU-6102	NMU-2084
C _{max} (nmol/l)	42.3	7.7	10.6	29.6
T _{max} (h)	4.00	4.00	2.00	8.00
AUC _{0-24h} (nmol · h/l)	606.1	46.6	68.1	493.7
MRT (h)	9.63	4.97	4.61	13.06

ペプチドは 10 nmol/kg で投与した。各パラメーターは血漿濃度の平均値(n=3)から算出し、標準品の用量でノーマライズした値で示した。C_{max}, 最高血中濃度、T_{max}, 最高血中濃度到達時間、AUC, 薬物濃度-時間曲線下面積、MRT, 平均滞留時間。*, 引用論文(64)より

2-2-2. DIO マウスを用いた 2 週間反復投与試験による薬効比較

DIO マウスにおける反復投与に用いた各化合物の用量は正常マウスを用いた夜間摂餌抑制率が同等となるように設定したが、下記に示す用量の差はおそら

く細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用および/または血中暴露量に基づくと考えられた。まず、NMUR1/R2 非選択的作動薬である NMU-0002 と NMU-6014 の抗肥満作用を比較検討した。10、30 nmol/kg の NMU-0002 と 50、150 nmol/kg の NMU-6014 を 2 週間反復投与した結果、コントロール群の体重に顕著な変化はなく 14 日目における体重変化率は -0.86 %であった (図 4a)。これに対して、NMU-0002 投与群では用量依存的な体重低下作用を示し、14 日目における体重変化率は 10、30 nmol/kg でそれぞれ -10%、-19% (図 4a) であったが、NMU-6014 投与群の 14 日目における体重変化率は 50、150 nmol/kg でそれぞれ -15%、-17%と下げ止まりが見られた (図 4a)。同様に、積算摂餌量でも NMU-0002 は用量依存的な摂食抑制作用を示したが、NMU-6014 ではいずれの用量でも同等の抑制効果であった (図 4b)。この時、投与 1 から 4 日後に NMU-0002 および NMU-6014 投与群で水様便を伴う重度の下痢が認められたが、その後軽快し、5 日後には正常化した。

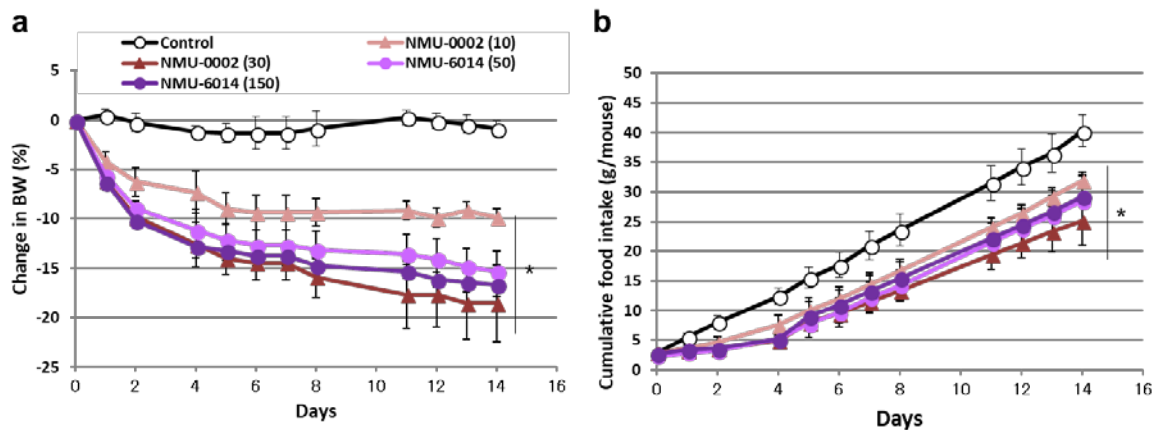


図 4. DIO マウスにおける体重(a)および摂餌量(b)に対する NMUR1/R2 非選択的作動薬の 2 週間反復投与の効果

ビーグル、NMUR1/R2 非選択的作動薬 NMU-0002 (10, 30 nmol/kg)あるいは NMU-6014 (50, 150 nmol/kg) を DIO マウスに 2 週間反復投与した。(a)ベースラインからのパーセンテージとして表記した体重変化、(b)マウス当たりの 2 週間累積摂餌量。化合物は 1 日 1 回皮下より投与した。データは平均値±SD を表す(n=6)。*; P < 0.05, ダネットの多重比較試験を用いた一方向 ANOVA で求めたコントロールに対する有意差。

次に、NMUR1 選択的作動薬である NMU-6102 を 300、1000 nmol/kg の用量で比較した。NMU-6102 は、用量依存的な摂食抑制（図 5b）を伴う体重低下効果（図 5a）を有していた。14 日目における体重変化率は、300、1000 nmol/kg でそれぞれ -8%、-12%であった。下痢は NMUR1/R2 非選択的ペプチドと同様に投与 1 から 4 日後に認められ 5 日後には正常化した。

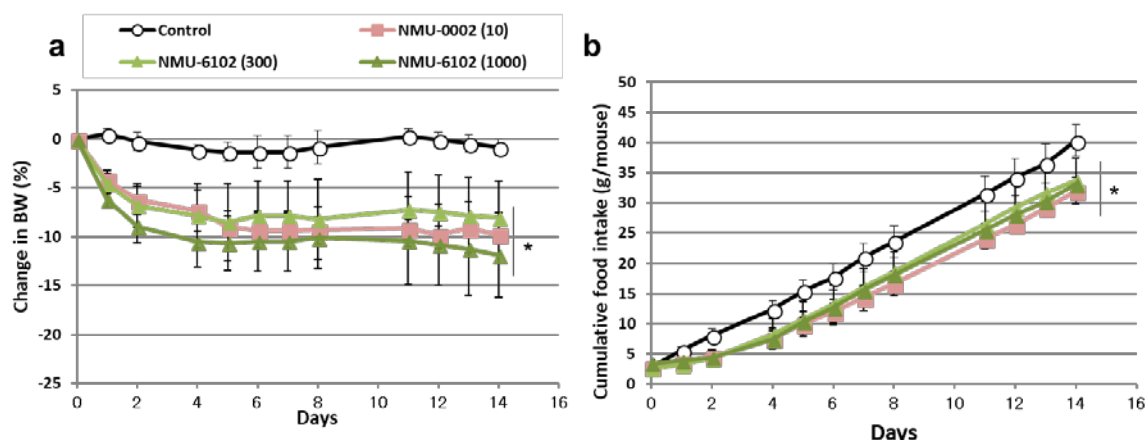


図 5. DIO マウスにおける体重(a)および摂餌量(b)に対する NMUR1/R2 非選択的作動薬と NMUR1 選択的作動薬の 2 週間反復投与の薬効比較

ビーグル、NMUR1/R2 非選択的作動薬 NMU-0002 (10 nmol/kg)あるいは NMUR1 選択的作動薬 NMU-6102 (300, 1000 nmol/kg)を DIO マウスに 2 週間反復投与した。(a)ベースラインからのパーセンテージとして表記した体重変化、(b)マウス当たりの 2 週間累積摂餌量。化合物は 1 日 1 回皮下より投与した。データは平均値±SD を表す(n=6)。*; P < 0.05, ダネットの多重比較試験を用いた一方向 ANOVA で求めたコントロールに対する有意差。

引き続き DIO マウスを用いて NMUR2 選択的作動薬との抗肥満作用を比較検討した。14 日目における体重変化率はコントロール群で -1.2%、NMU-0002 (10 nmol/kg) 投与群は -11.6%、これに対して NMU-2084 (30, 100, 300 nmol/kg) 投与群の体重変化率はそれぞれ、-6.0%、-9.6%、-13.8%と用量依存的な体重低下作用が認められた（図 6a, 6b）。このとき摂食抑制作用は体重低下作用の強さに応じて認められた。10 nmol/kg の NMU-0002 と 100 nmol/kg の NMU-2084 は同等の抗

肥満作用を發揮するが、NMU-2084 では下痢が軽減していた。いずれの化合物においても DIO ラットにおいて休薬後の体重のリバウンドは認められなかった。

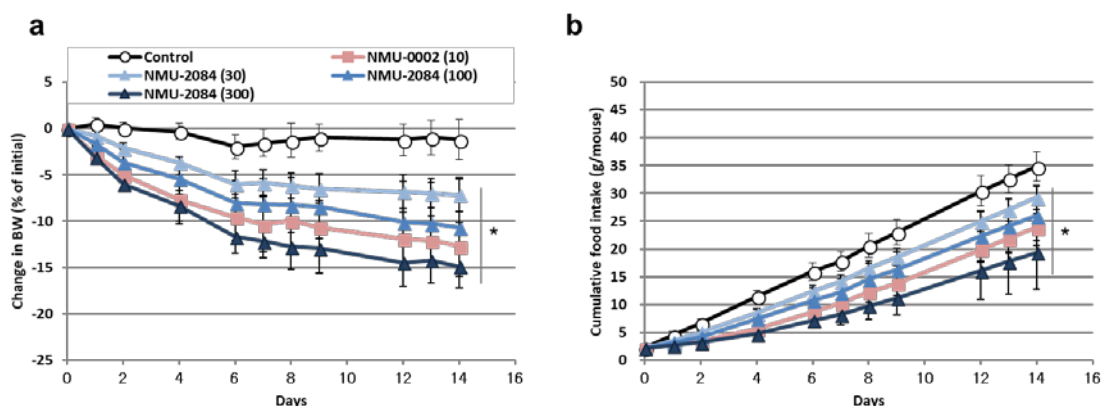


図 6. DIO マウスにおける体重(a)および摂餌量(b)に対する NMUR1/R2 非選択的作動薬と NMUR2 選択的作動薬の 2 週間反復投与の薬効比較

ビークル、NMUR1/R2 非選択的作動薬 NMU-0002 (10 nmol/kg)あるいは NMUR2 選択的作動薬 NMU-2084 (30, 100, 300 nmol/kg)を DIO マウスに 2 週間反復投与した。(a)ベースラインからのパーセンテージとして表記した体重変化、(b)マウス当たりの 2 週間累積摂餌量。化合物は 1 日 1 回皮下より投与した。データは平均値±SD を表す(n=6)。*; P < 0.05, ダネットの多重比較試験を用いた一方向 ANOVA で求めたコントロールに対する有意差。

2-2-3. 正常マウスにおける消化管ホルモン分泌に対する作用

正常マウスを用いて NMU 受容体作動薬のペプチド YY (PYY)、コレシストキニン (CCK)、デスアシルグレリン (活性アシル化グレリンレベルを反映するグレリンの安定な形態) の分泌に対する影響を検討した。コントロール群と比較して、NMUR1/R2 非選択的作動薬 NMU-0002 (100 nmol/kg)あるいは NMU-6014 (500 nmol/kg) 投与群では、血漿中 PYY 濃度が有意に上昇し (図 7a)、CCK (図 7b) およびデスアシルグレリン (図 7c) は有意に低下した。NMUR1 選択的作動薬 NMU-6102 (3000 nmol/kg)あるいは NMUR2 選択的作動薬 NMU-2084 (3000 nmol/kg) に関しては、NMU-6102 投与群では NMUR1/R2 非選択的作動薬と同様に、血漿中 PYY 濃度の上昇、CCK およびデスアシルグレリンの低下が認められたが、NMU-2084 投与群ではいずれのホルモンも有意な変動はなかった (図 7)。

以上の結果から、各消化管ホルモンの変動に寄与する NMU 受容体サブタイプは、NMUR1 であることが示唆された。

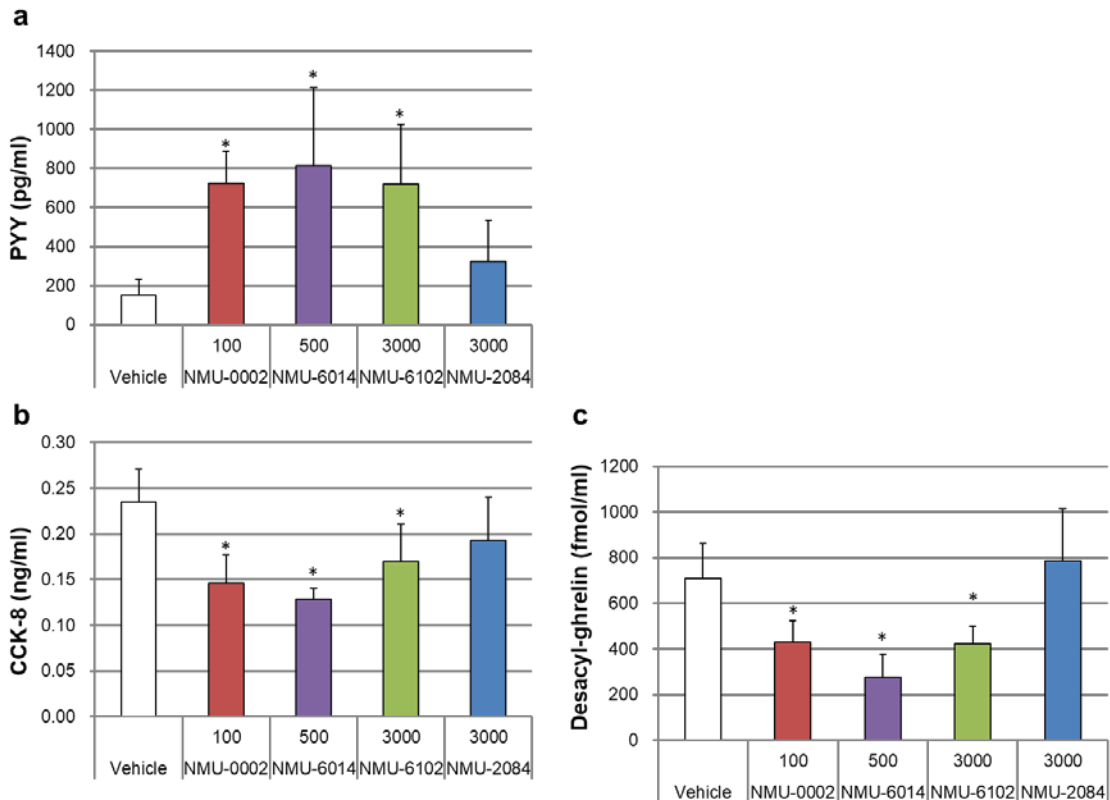


図 7. マウスにおける NMUR1/R2 非選択的、NMUR1 あるいは NMUR2 選択的作動薬の血漿腸管ホルモンレベルに対する影響

ビークル、NMUR1/R2 非選択的作動薬 NMU-0002 (100 nmol/kg)あるいは NMU-6014 (500 nmol/kg)、NMUR1 選択的作動薬 NMU-6102 (3000 nmol/kg)、または NMUR2 選択的作動薬 NMU-2084 (3000 nmol/kg)をマウス皮下に単回投与し、4 時間後の血漿中 PYY (a)、CCK-8 (b)およびデスアシルグレリン(c)レベルを測定した。データは平均値+SD を表す(n=6)。

* P < 0.05, ダネットの多重比較試験を用いた一方向 ANOVA で求めたコントロールに対する有意差。

2-2-4. NMUR1 および NMUR2 選択的作動薬による視床下部における c-Fos 発現

末梢投与された NMUR1 および NMUR2 選択的作動薬のメカニズム的な見識を得るために、摂食制御の中心的な領域である視床下部の弓状核 POMC ニューロンおよび室傍核における c-Fos 発現誘導を調べた。特に弓状核 POMC ニューロンの活性化は食欲抑制反応を媒介するため、弓状核における POMC 陽性ニューロンと迷走神経系を介して満腹感および悪心に関連する重要な領域である延髄孤束核および最後野における c-Fos レベルを評価した。NMUR1/R2 非選択的作動薬 NMU-0002 (30 nmol/kg) および NMU-6014 (300 nmol/kg) は、弓状核における POMC 発現ニューロンを活性化し、室傍核における c-Fos 免疫反応性細胞数を増加させ (図 8a、8b)、さらに孤束核および最後野 (図 9a、9b) においても用量依存的に増加させた。NMUR1 選択的作動薬 NMU-6102 は、室傍核 (図 8c、8d)、孤束核および最後野 (図 9c、9d) における c-Fos 免疫反応性細胞数を用量依存的に増加させたが、弓状核 POMC 発現ニューロンには影響を与えなかった (図 8c、8d)。一方、NMUR2 選択的作動薬 NMU-2084 は、弓状核 POMC 発現ニューロン (図 8c、8d) および孤束核、最後野 (図 9c、9d) を活性化させたが室傍核には影響しなかった (図 8c、8d)。これらのデータは、末梢投与された NMUR2 選択的作動薬が、弓状核の NMUR2 を介して POMC ニューロンを直接活性化するか、または間接的に活性化して抗肥満効果を発揮することを示唆する。

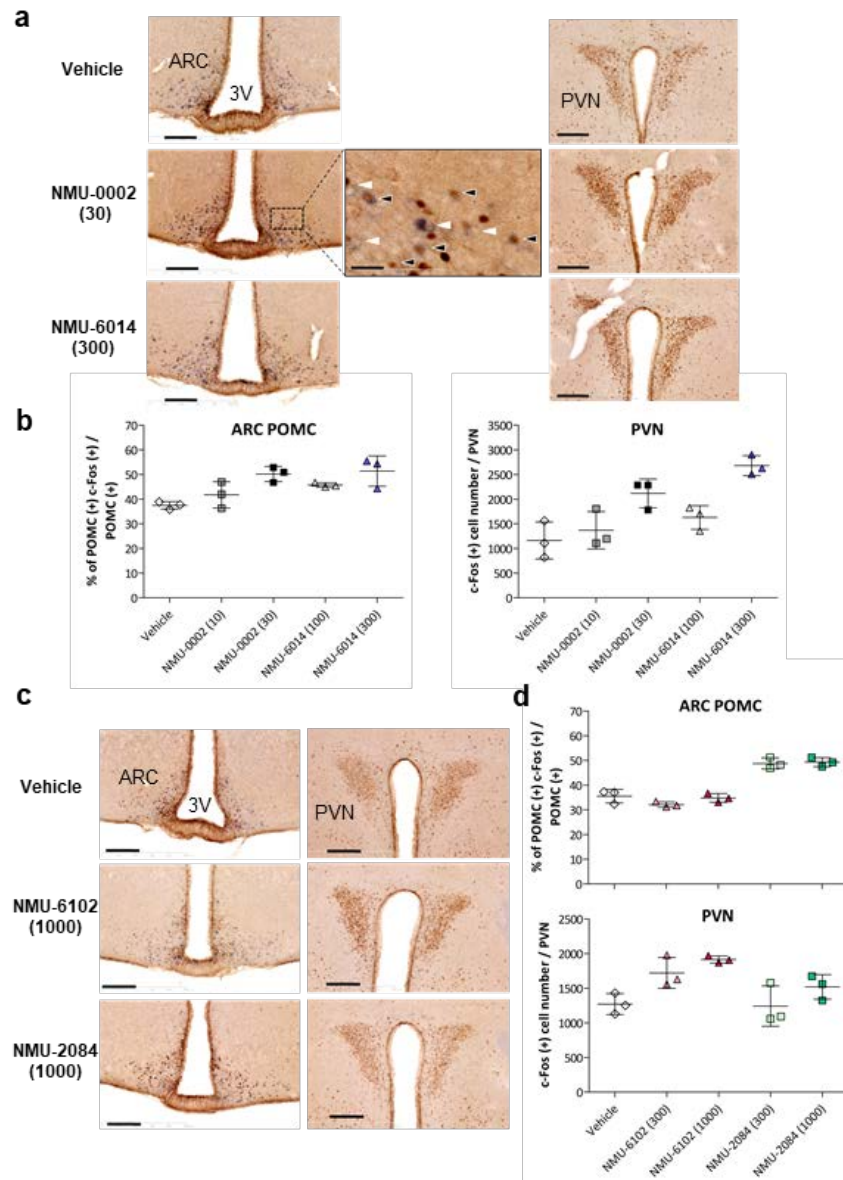


図 8. マウスにおける NMUR1/R2 非選択的、NMUR1 あるいは NMUR2 選択的作動薬の視床下部 c-Fos 発現に対する影響

通常食を与えたマウスにビーケル、NMUR1/R2 非選択的アゴニストである NMU-0002 (10, 30 nmol/kg)あるいは NMU-6014 (100, 300 nmol/kg)を投与後の(a) *in situ*ハイブリダイゼーション (ISH)で同定した弓状核 (ARC)POMC ニューロンと室傍核 (PVN)の c-Fos 免疫組織化学的イメージ。四角で囲んだ部位の高倍率で撮影した画像を中央に示した。白い矢印は POMC 陽性 (青) /c-Fos 陰性ニューロンを、黒い矢印は POMC 陽性/c-Fos 陽性ニューロン (茶色) を示している。(b) c-Fos 陽性細胞数を示す。(c) NMUR1 選択的作動薬 NMU-6102 (300, 1000 nmol/kg)あるいは NMUR2 選択的作動薬 NMU-2084 (300, 1000 nmol/kg)を投与後の ISH で同定した ARC POMC ニューロンと PVN の c-Fos 免疫組織化学的イメージ。(d) c-Fos 陽性細胞数を示す。化合物は単回で腹腔内投与し、3 時間後に脳を採取した。データは平均値±SD (n=3)。3V、第三脳室。スケールバー、200 μm[(a)における高倍率撮影画像は 30 μm]。n=3 のため統計は未処理。

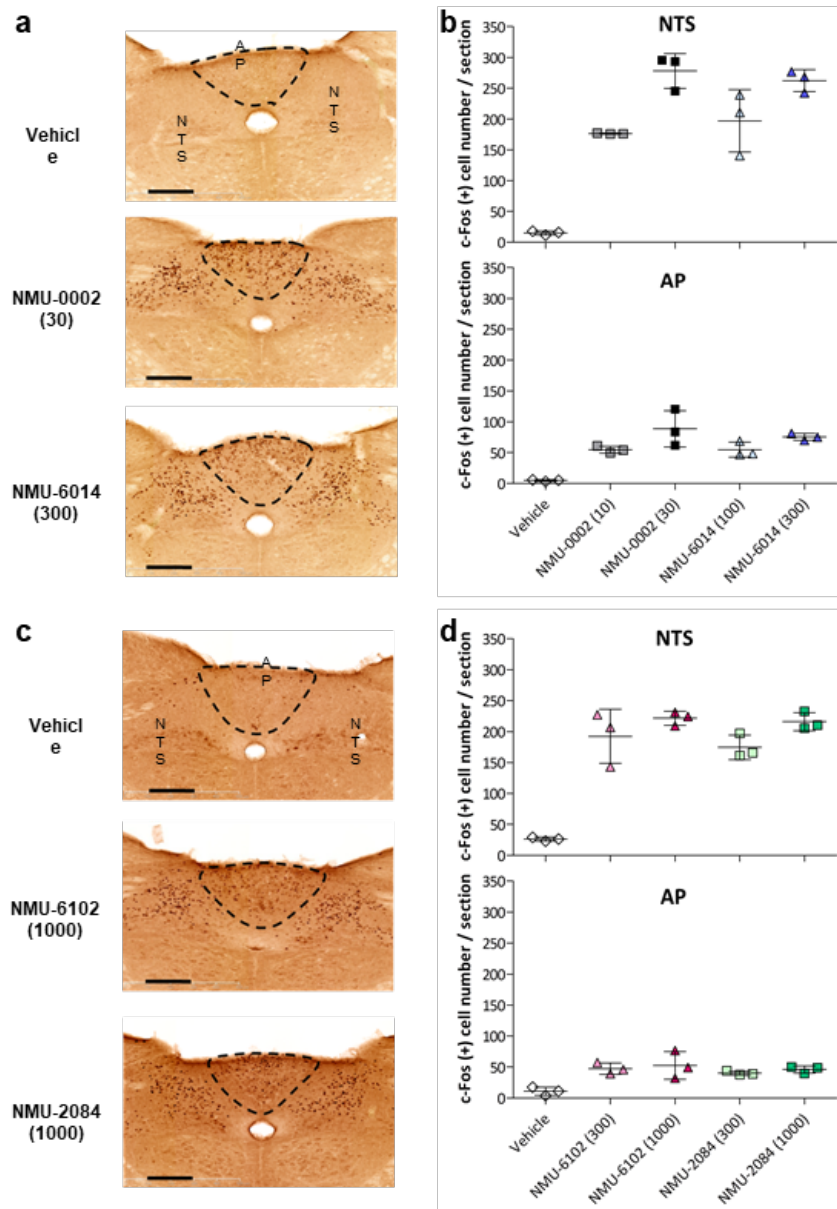


図 9. マウスにおける NMUR1/R2 非選択的、NMUR1 あるいは NMUR2 選択的作動薬の延髄 c-Fos 発現に対する影響

通常食を与えたマウスにビークル、NMUR1/R2 非選択的アゴニストである NMU-0002 (10, 30 nmol/kg)あるいは NMU-6014 (100, 300 nmol/kg)を投与後の(a) 孤束核(NTS)と最後野(AP)の c-Fos 免疫組織化学的イメージ。(b) c-Fos 陽性細胞数を示す。(c) NMUR1 選択的作動薬 NMU-6102 (300, 1000 nmol/kg)あるいは NMUR2 選択的作動薬 NMU-2084 (300, 1000 nmol/kg)を投与後の NTS と AP の c-Fos 免疫組織化学的イメージ。(d) c-Fos 陽性細胞数を示す。化合物は単回で腹腔内投与し、3 時間後に脳を採取した。データは平均±SD (n=3)を表す。n=3 のため統計は未処理。

2-2-5 血中コルチコステロン変化

NMUR1/R2 非選択的作動薬および NMUR1 選択的アゴニストは、室傍核を活性化したが、NMUR2 選択的作動薬では活性化が見られなかった。HPA 系への影響を調べるために血中コルチコステロン濃度を測定した結果、NMUR1/R2 非選択的作動薬 NMU-0002 ではコルチコステロンレベルが上昇したが、NMUR2 選択的作動薬 NMU-2084 では変化が見られなかった (図 10)。NMU-6102 は未測定である。

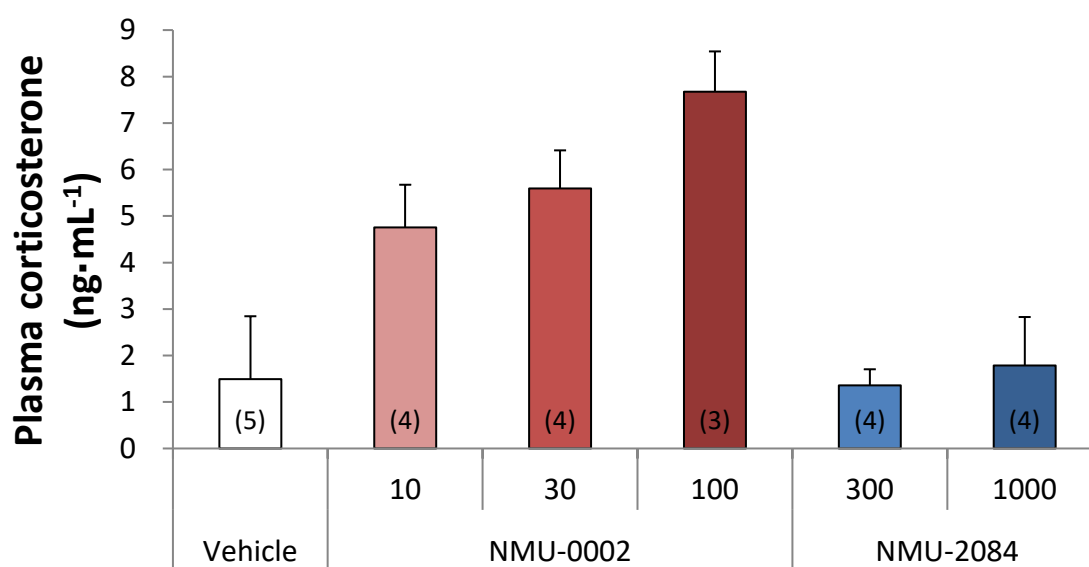


図 10. マウスにおける NMUR1/R2 非選択的、NMUR2 選択的作動薬の血漿コルチコステロンレベルに対する影響

通常食を与えたマウスにビークル、NMU-0002 (10, 30, 100 nmol/kg)あるいは NMU-2084 (300, 1000 nmol/kg)を腹腔内投与 3 時間後に血漿コルチコステロン濃度を測定した。データは平均値+SD を表す(n=3-5 でグラフ中に示した)。n 数が異なるため統計は未処理。

第 2 - 3 節 考察

末梢投与された NMUR1/R2 非選択的作動薬、NMUR1 あるいは NMUR2 選択的作動薬の薬理的有効性 (摂食抑制および体重低下作用) および副作用 (下痢) について DIO マウスを用いて比較検討した。その結果、NMUR2 選択的作動薬

はDIOマウスにおいてNMUR1選択的作動薬よりも強力な体重低下作用を有し、下痢が軽減することを見出した。また、NMUR2選択的作動薬は視床下部の弓状核 POMC ニューロンを選択的に活性化したが、室傍核は活性化しなかった。さらに、NMUR1選択的作動薬はNMUR1/R2非選択的作動薬と同様に正常マウスの腸管ホルモンに影響を与えたが、NMUR2選択的作動薬では影響が見られなかった。

NMUR1/R2非選択的作動薬 NMU-0002、NMU-6014 および NMUR2 選択的作動薬 NMU-2084 と比較して、NMUR1 選択的作動薬 NMU-6102 は DIO マウスにおける抗肥満効果に限度があり、NMUR2 選択的作動薬は NMUR1 選択的作動薬より体重低下作用が優れていた。NMUR1 選択的作動薬の有効性に限界があるのは、摂食行動調節および体重低下に対して NMUR1 の寄与が低いためではないかと考える。実際これまでの研究では、長時間作用型 NMU 類似体を末梢投与すると NMUR2 KO マウスにおいては持続的な薬効を示さないが、NMUR1 KO マウスにおいては薬効が持続することが示されている(58, 59)。ここで得られた結果は、薬効および有害事象の観点から NMUR2 選択的作動薬が抗肥満薬として最も有効であることを示している。

メカニズム的にも、末梢投与された NMUR1 および NMUR2 選択的作動薬は視床下部における c-Fos の免疫組織化学的解析によって示されたように、神経活性化のパターンが異なっていた。NMUR2 mRNA は弓状核と室傍核の両方で発現しており(51, 66)、中枢の NMU は弓状核と室傍核の両方を活性化する(38, 67-69)。末梢投与された NMUR2 選択的作動薬の NMU-2084 は、弓状核 POMC ニューロンを活性化したが、室傍核は活性化しなかった。これらは、中枢あるいは末梢投与による活性化が異なる経路を介していることを示唆している。すなわち、弓状核は血液脳関門によって循環因子から完全に隔離されていないため(70)、末梢投

与された NMU-2084 がアクセスすることによって直接活性化されたが、中枢投与による直接的かつ高濃度の NMU による活性化とは異なり、室傍核は血液脳関門によって隔離されているため弓状核からの神経伝達による間接的な活性化が検出できなかったと推察している。対照的に NMUR1 選択的作動薬は室傍核を活性化したが、弓状核 POMC ニューロンを活性化しなかった。おそらく NMUR1 の発現が視床下部において非常に低く(71)、末梢に発現している NMUR1 から迷走神経の上行性の投射を介した結果と推定した。これは血漿コルチコステロンレベルが NMUR1/R2 非選択的作動薬の NMU-0002 では上昇したが、NMUR2 選択的作動薬 NMU-2084 では変化がなかった結果と関連している。NMUR2 選択的作動薬は、POMC ニューロンを優先的に活性化して摂食抑制作用を示すが、NMUR1 選択的作動薬は室傍核を活性化しストレス応答（以下に論じる）作用を惹起する可能性がある。

以前の報告(53)と合致して、血漿 PYY レベルが上昇すること、さらに CCK およびデスアシルグレリンが NMUR1 依存的に減少することを見出した。PYY および GLP-1 の増加と急性の NMU による摂食抑制および体重減少には関係性がないことが報告されている(53)。CCK およびグレリンレベルの減少に関しては不明である。グレリンは現在知られているホルモンのうち唯一摂食を亢進する分子で、グレリンの低下は NMUR1 活性化による食欲抑制効果と関連していることが考えられる。しかし CCK の低下は、摂食抑制(27)や胃排出(66)の既知の NMU の機能とは矛盾しているため、CCK は NMU の食欲に関する機能には関与しないと考えられる。また、NMUR1 活性化が腸管ホルモンの血漿レベルに影響を与える経路は未知であるものの、NMUR1 mRNA は腸管全体にわたって粘膜層に検出され、胃粘膜の細胞中に散在する(66)ことから、NMUR1 作動薬がこれらの腸管ペプチドの分泌を直接調節する可能性も考えられる。

NMU の単回脳内投与は ob/ob マウスおよび db/db マウス(38)において食欲抑制効果を発揮し、NMU の末梢投与もまた db/db マウスにおいて食欲抑制効果をもたらす(53)ことから、レプチンは NMU の薬効発揮には重要ではないと考えられている。今回、NMUR1/R2 非選択的および選択的作動薬がいずれも末梢レプチンに対して耐性であることが知られている DIO マウス(72, 73)において有効であった結果はこの考えと合致している。

治療薬を考える上では、副作用に対して十分な考慮をする必要がある。NMUR1/R2 作動薬にはいくつかの潜在的な副作用すなわち、痛み(55)、ストレス反応(27)および倦怠感(53) が想定され得る。NMU を室傍核に直接注入することによって惹起されるストレス応答は、必ずしも食欲抑制効果につながるわけではなく(74)、NMU を長期間中枢あるいは末梢投与した試験では、エンドポイントにおける血漿コルチコステロンレベルに変化はなかった(52, 53)。今回 NMUR1/R2 非選択的作動薬を単回投与後、血漿コルチコステロンレベルが上昇したが、NMUR2 選択的作動薬では変化が見られなかった。これは、急性の末梢 NMUR1 活性化が HPA 系を刺激することを示唆している。また、NMUR1 活性化が下痢を引き起こすことを観察したがメカニズムは未知のままである。NMU はイオン分泌(75)と小腸通過(24)を促進し、NMUR1 活性化は大腸の運動性を亢進すると考えられている(76)ことから、NMUR1 の活性化は消化管に影響を与えることによって下痢を直接引き起こす可能性がある。また、NMUR1 は下痢に関連することが知られている室傍核を活性化したことから、室傍核の活性化と CRH 放出因子による間接的な作用である可能性もある(77-79)。室傍核で活性化されるニューロンサブタイプを同定することができていないので、ニューロンの同定はさらなる考察のために残されている今後の課題である。

第2-4節 結論

肥満マウスモデルにおける末梢投与後の NMUR1 および NMUR2 に対する非選択的、あるいは選択的作動薬による効果の差異を明確にした。各作動薬に関して利点および問題点を表 6 に示す。NMU 受容体作動薬の末梢投与により、NMUR1、NMUR2 のいずれを介しても摂食抑制作用を伴う体重低下が見られた。しかしながら、抗肥満薬には薬効に加えて高い安全性が求められており、マウスで見られた水様便を伴うような重度の下痢は、継続すると脱水症状を起し、循環動態や電解質の異常をきっかけとする全身状態の悪化を引き起こすことも少なくなく、重篤副作用疾患別マニュアルが定められている（平成 22 年 3 月、厚生労働省）。従って、NMUR2 選択的作動薬が有効性および安全性に関して肥満症治療のためのバランスのとれた薬物であると考え、標的受容体として NMUR2 を選択した。今回同定された NMUR1 あるいは R2 選択的作動薬は、病態が異なる生理学的状況において NMU が有する多様な機能を解明するのに有用なツールであると考えられる。

表 6. NMUR1/R2 非選択的および選択的アゴニストの比較

	利点	問題点
R1/R2 非選択的	食欲抑制による抗肥満作用 血漿中消化管ホルモンの変動 (臨床バイオマーカーの可能性)	下痢 (R1活性化を介すると推定)
R1 選択的	血漿中消化管ホルモンの変動 (臨床バイオマーカーの可能性)	DIOマウスで緩和な作用 下痢
R2 選択的	食欲抑制による抗肥満作用 副作用 (下痢) 軽減	

第3章 ニューロメジンU受容体2選択的作動薬の薬理学的研究

第3-1節 序論

中枢 NMU シグナル伝達系は、NMUR2 を介して摂食、エネルギーバランスおよび体重を調節しており、これまでに食欲抑制作用を示す NMUR2 作動薬は肥満症治療への可能性を有することが報告されている。第2章の研究結果より、肥満症治療薬として副作用懸念が小さく、且つ強い抗肥満作用が期待できるバランスの良い NMU 受容体作動薬としては、NMUR2 選択的作動薬が最も有望であるとの結論を得たので、引き続き NMUR2 選択的作動薬の開発研究を行った。本章では、開発候補化合物として同定した新規 NMUR2 選択的 PEG 化オクタペプチドである NMU-7005(65)を用いて DIO マウスを用いた4週間反復投与を行い、摂食および体重に対する効果を調べ、NMUR2 KO マウスを用いて NMUR2 を介した薬効であることを確認した。また、既存薬との併用効果を調べるために GLP-1 受容体作動薬の一つであるリラグルチドとの共投与試験を実施し、さらに消化器における副作用について調べるために条件付け味覚嫌悪 (Conditioned taste aversion, CTA) 試験を行った。また、中枢組織での活性化を確認するため末梢投与後に急性の中枢組織における c-Fos の免疫反応性を調べた。

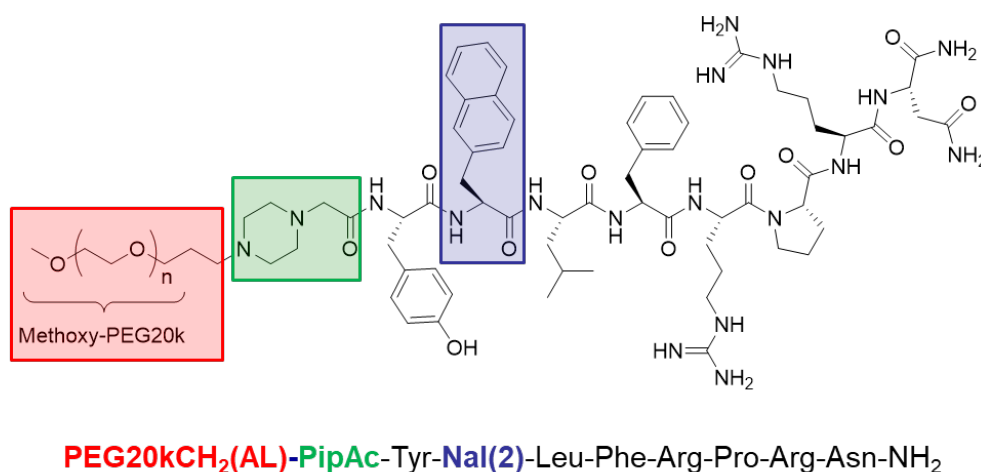


図 11. NMU-7005 の構造式

引用論文(65)より改変

キーワード：摂食抑制、抗肥満、NMU、NMUR2、NMU-7005、リラグルチド、
中枢神経系

第3-2節 結果

3-2-1. ペプチド構造および細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用

ヒトあるいはマウス NMUR1 または NMUR2 を安定的に発現する CHO 細胞における Ca^{2+} 動員アッセイを用いて、NMUR2 に対して強力な作動活性を有するペプチドを探索するため、短鎖ペプチド体でおよそ 600 検体、PEG 修飾体でおよそ 250 検体を合成しスクリーニングを実施した。その結果、新規の強力な NMUR2 選択的作動薬である PEG 化オクタペプチド(PEG20k-PipAc-Tyr-Nal(2)-Leu-Phe-Arg-Pro-Arg-Asn-NH₂)である NMU-7005 を見出した(65)。ヒトおよびマウス NMUR2 に対する EC₅₀ はそれぞれ 8.8 nM および 1.0 nM であったが、ヒトおよびマウス NMUR1 に対する NMU-7005 の EC₅₀ はいずれも > 1000 nM であった (表 7)。

表 7. NMU-7005 の構造式および細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用

構造	PEG20k-PipAc-Tyr-Nal(2)-Leu-Phe-Arg-Pro-Arg-Asn-NH ₂			
	EC ₅₀ (nM)		EC ₅₀ (nM)	
細胞内Ca ²⁺ 上昇作用	hNMUR1	hNMUR2	mNMUR1	mNMUR2
	> 1000	8.8	> 1000	1.0

3-2-2. DIO-C57BL/6J マウスにおける NMU-7005 の 4 週間反復投与の抗肥満効果

まず DIO マウスにおける NMU-7005 の抗肥満効果を調べるために、31 週齢の雄性 C57BL/6J マウスにビークルまたは NMU-7005 (10, 30, 100 nmol/kg) を 1 日 1 回、28 日間皮下投与した。図 12a に示すように、NMU-7005 を投与したマウスでは 28 日間の総摂餌量は有意かつ用量依存的に減少していた。体重も同様に投与開始翌日から減少し、最終的な平均体重減少はビークル群の -0.55% と比較して、10、30 および 100 nmol/kg NMU-7005 投与群でそれぞれ -7.19%、-12.50% および -21.09% の用量依存的で有意な低下が認められた (図 12b)。経時的な体組成分析の結果、この体重減少は主に脂肪量の減少によるものであり、いずれの用量の NMU-7005 においても除脂肪量に対する有意な変化は認められなかった (図 12c、12d)。また、NMU-7005 は肝臓および生殖器周囲、腸間膜および皮下の脂肪重量を用量依存的に減少させ (図 12e)、肝臓中の TG 含量は NMU-7005 処置群において用量依存的に有意に減少した (図 12f)。生化学パラメーターとしては、ビークル群と比較して血漿 IRI、T-Cho、AST および ALT レベルの有意な減少を示した (表 8)。

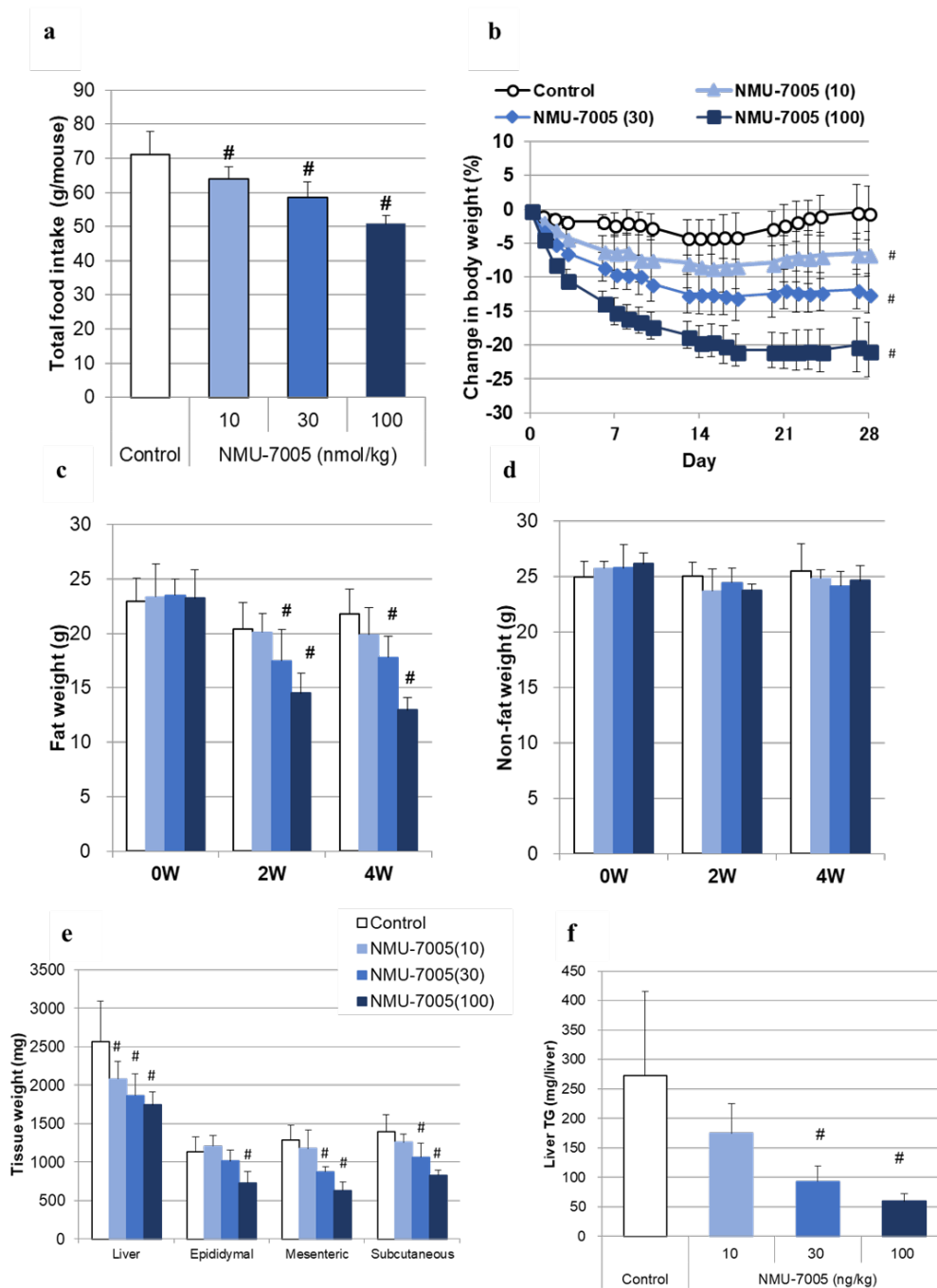


図 12. DIO マウスを用いた摂餌量、体重変化率、体組成、肝 TG 含量に対する NMU-7005 の 4 週間反復投与による抗肥満作用

NMU-7005 (10, 30, または 100 nmol/kg) を DIO マウスに 28 日間、1 日 1 回皮下に投与した。図は総摂餌量(a)、体重変化率(b)、体組成；脂肪量(c)および除脂肪量(d)、組織重量(e)、および肝 TG 含量(f)を示している。データは平均値±SD を表す(n=6)。#p < 0.025, パラメトリックウイリアムズ検定法で求めたコントロールに対する有意差。

表 8. DIO マウスにおける NMU-7005 の 4 週間反復投与後の血中生化学的指標

	Control	NMU-7005		
		10 nmol/kg	30 nmol/kg	100 nmol/kg
Glu (mg/dL)	143.2 ± 11.10	150.5 ± 10.15	140.1 ± 7.67	145.1 ± 5.31
GHb (%)	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.2	4.05 ± 0.1
IRI (ng/mL)	9.6 ± 5.1	5.0 ± 4.1	6.3 ± 3.4	4.227 ± 2.0 #
TG (mg/dL)	88.7 ± 30.0	78.1 ± 11.9	76.0 ± 7.3	95.65 ± 27.6
T-Cho (mg/dL)	235.6 ± 9.63	216.4 ± 14.24	209.7 ± 23.33 #	195.8 ± 16.00 #
AST (IU/L)	139.3 ± 38.51	119.2 ± 22.23	95.57 ± 21.87 #	83.25 ± 16.82 #
ALT (IU/L)	108.8 ± 37.4	90.8 ± 30.7 #	66.2 ± 17.5 #	46.04 ± 13.4 #

p<0.025, パラメトリックウイリアムズ検定法で求めたコントロールに対する有意差。;・ Glu, グルコース、GHb, グリコヘモグロビン、IRI, 免疫反応性インスリン、TG, トリグリセリド、T-Cho, 総コレステロール、AST, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ALT, アラニンアミノトランスフェラーゼ

3-2-3. DIO マウスにおける NMU-7005 の薬物動態パラメーター

DIO マウスで皮下投与した NMU-7005 の薬物動態プロファイルを調べた。薬物動態パラメーターを 30 nmol/kg 用量の単回（すなわち、1 回）および 14 回投与後に測定した。NMU-7005 は 1 回および 14 回投与でそれぞれ 8 および 12 時間の T_{max} と 1438 および 2260 nmol/h の AUC_{0-24h} を有する持続的な薬物動態プロファイルを示し、C_{max}、T_{max}、AUC_{0-24h} および MRT 値は、1 回目と 14 回目の投与で同等であった（表 9）。

表 9. DIO マウスにおける単回および反復皮下投与後の血漿中 NMU-7005 濃度推移

	1 st	14 th
C _{max} (nmol/L)	91.1	118.3
T _{max} (h)	8.00	12.00
AUC _{0-24h} (nmol·h/L)	1437.7	2260.3
MRT (h)	9.98	11.57

NMU-7005 (30 nmol/kg/日)を 14 日間 DIO マウスに皮下から反復投与を行った。血漿サンプルは 1 日目および 14 日目に投与 0 (14 回目のみ), 0.5, 2, 4, 8, 12, および 24 時間後に採取した。パラメーターは血漿中濃度の平均値より算出した(n=3)。

3-2-4. NMUR2 KO マウスにおける摂食および体重に対する NMU-7005 およびリラグルチドの単回投与の影響

NMU-7005 の摂食抑制効果が NMUR2 に対して特異的であるか否かを確認するために、野生型および NMUR2 KO マウスにおける NMU-7005 の摂食抑制効果を比較した。投与前の NMUR2 KO マウスの体重は 32.75 ± 2.03 g、野生型マウスの体重は 32.05 ± 2.07 g と差は認められなかった。野生型マウスでは、300 nmol/kg NMU-7005 の単回皮下投与はコントロールの生理食塩水投与群に対して摂餌量および体重を有意に減少させた (図 13a、13b) が、NMUR2 KO マウスでは、コントロール群と比較して摂餌量および体重に有意な変化を示さなかった。対照的に、GLP-1 受容体作動薬である 100 nmol/kg のリラグルチドの投与は、野生型および NMUR2 KO マウスの摂餌量および体重の有意な減少をもたらした (図 13a、13b)。

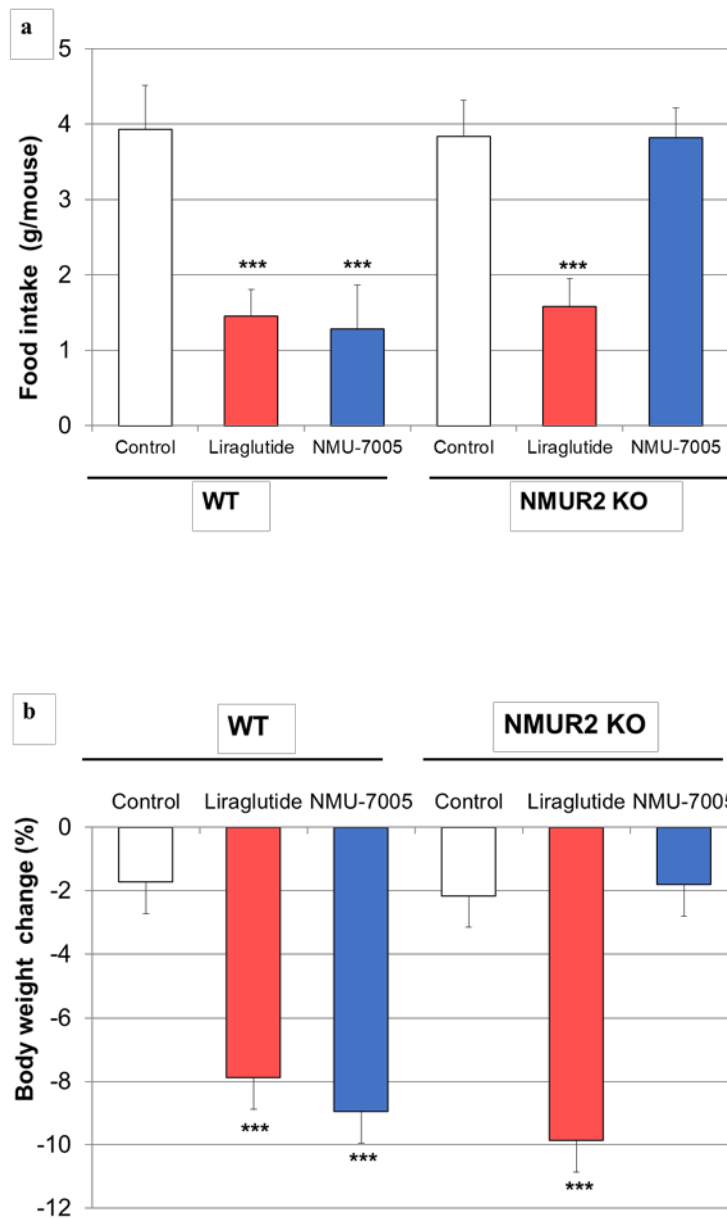


図 13. 野生型(WT)および NMUR2 ノックアウト(KO)マウスにおける NMU-7005 の皮下単回投与が摂食(a)および体重(b)に与える影響

雄性 WT あるいは NMUR2 KO マウスに生理食塩水、NMU-7005 (300 nmol/kg) あるいはリラグルチド(100 nmol/kg)を皮下投与後、予め秤量した標準飼料(CE-2)を与えた。摂餌量および体重は試験直前と直後に測定した。データは平均値±SD を表す(n=8)。*** p < 0.001, ダネット多重比較試験を用いた一方方向 ANOVA で求めたコントロールに対する有意差。

3-2-5. NMU-7005 の条件付け味覚嫌悪 (CTA)への影響

CTA は、食物や飲み物の新しい味覚刺激が内臓病や痛みなどの嫌悪的な経験として学習された行動である。げっ歯類には嘔吐中枢が存在しないため、CTA試験はげっ歯類を用いて消化管の不快感を調べるために広く使用されている実験モデルである。肥満症治療薬として用いられている臨床用量 (3 mg/人) から概算した用量である 10 nmol/kg のリラグルチドは、C57BL/6J マウスに対してサッカリン嗜好率を有意に低下させ味覚嫌悪を誘導した。対照的に、DIO マウスにおいて同等の体重低下作用を示した 30、およびその 3 倍量の 100 nmol/kg の NMU-7005 は、味覚嫌悪に有意な影響を及ぼさなかった (図 14)。

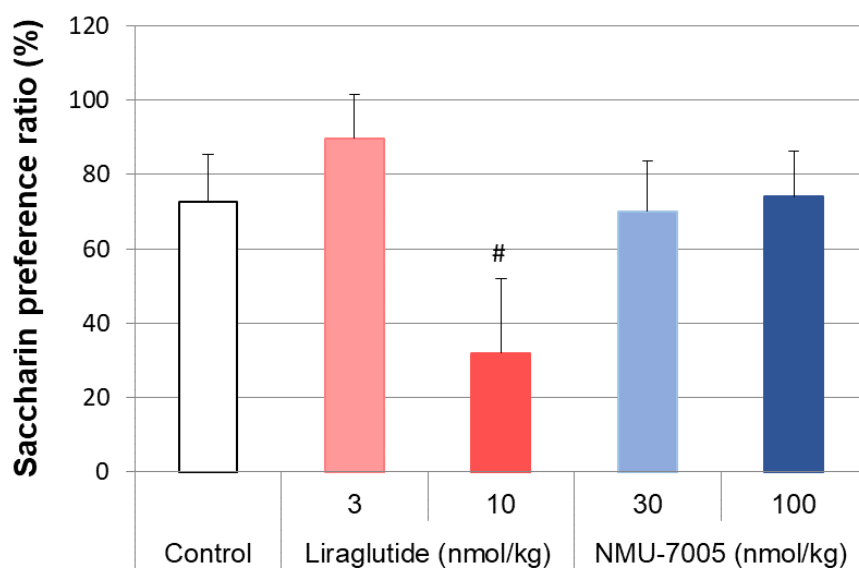


図14. マウスにおけるNMU-7005のCTAに対する影響

図はサッカリンに対する嗜好性を示している。被検化合物と関連づけるためにマウスに 0.1% サッカリン水を2回与えた。第2回目の条件付けの2日後に0.1% サッカリン水と水道水を同時に2時間給水して、それぞれの飲水量からサッカリンに対する嗜好性(%)を算出した。データは平均値+SDを表す(n=7)。#p<0.025, パラメトリックウイリアムズ検定法で求めたコントロールに対する有意差。

3-2-6. DIO マウスを用いたリラグルチドとの共投与あるいは非共投与における NMU-7005 の 2 週間反復投与の摂食抑制効果の検討

リラグルチドは DIO マウスにおいて強力な体重低下効果を示す。GLP-1 受容体および NMUR2 作動薬の併用効果を調べるために、DIO マウスを用いて 2 週間の反復投与を行った。30 nmol/kg NMU-7005 または 10 nmol/kg リラグルチドの単剤皮下投与により、いずれの化合物においても摂餌量および体重の有意な低下を認めた (図 15a、15b および 15c)。両化合物の共投与によりそれぞれの単剤投与と比較して体重および累積摂餌量のさらなる減少が見られ、各単剤療法よりも有意に強力であった。併用療法の有効性が双方向 ANOVA で相互作用はないと判定されたため、相加的な低下作用であると判断した (図 15c)。

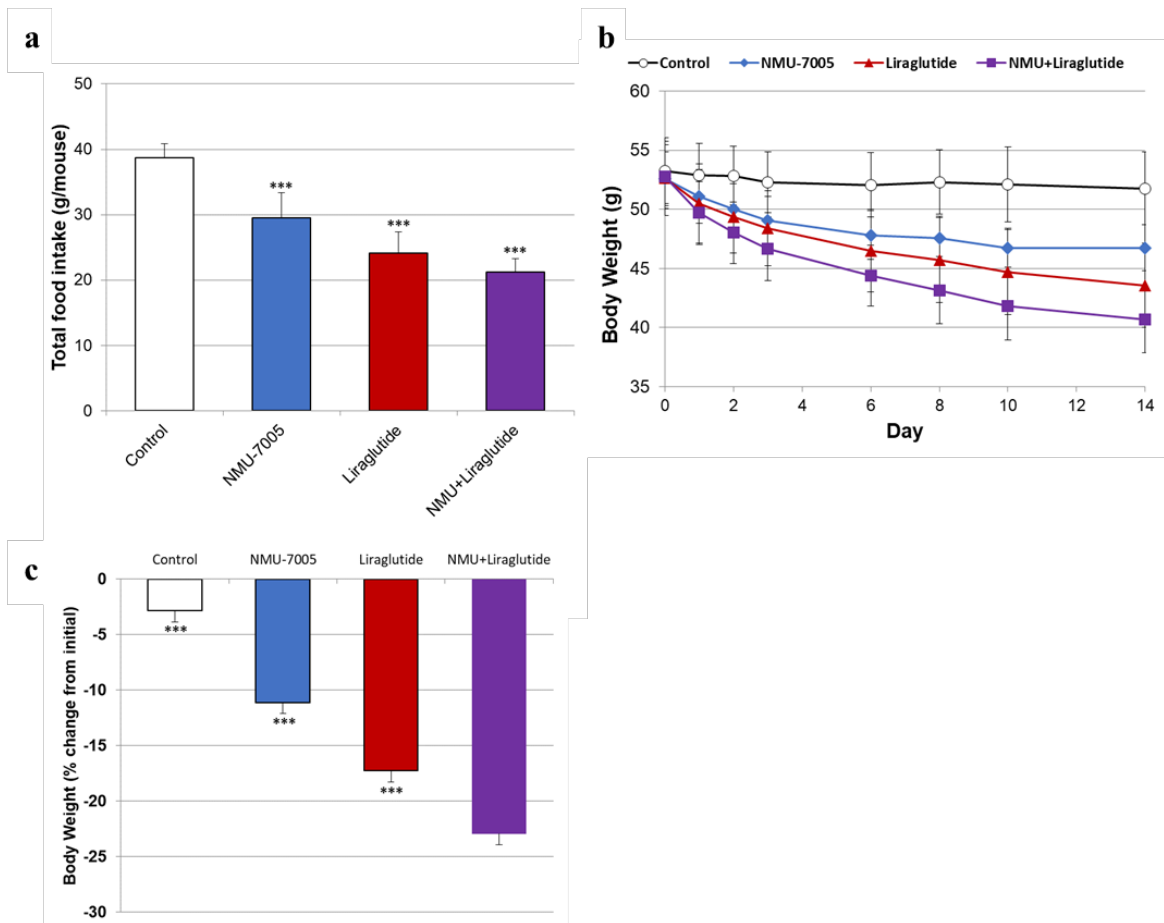


図 15. DIO マウスにおける NMU-7005 とリラグルチドの共投与による抗肥満作用に対する効果
 30 nmol/kg NMU-7005 および 10 nmol/kg リラグルチドの単独皮下投与、あるいは NMU-7005 (30 nmol/kg) と リラグルチド(10 nmol/kg)の共投与を DIO マウスで 2 週間実施した。図は総摂餌量(a)、試験期間中の体重変化(b)、および試験開始時からの体重変化率%(c)を示している。データは平均値±SD を表す(n=6)。*** p < 0.001, ダネット多重比較試験を用いた一方向 ANOVA で求めたコントロールに対する有意差(a)、あるいは NMU-7005 とリラグルチドの共投与群に対する有意差(c)。

3-2-7. 末梢投与された NMU-7005 の視床下部および延髄における c-Fos 様免疫反応性に対する影響

NMU-7005 投与後の中枢組織の活性化を調べるために、C57BL/6J マウスを用いて c-Fos マッピングを行った結果、ベークル処置マウスと比較して、100 nmol/kg NMU-7005 の末梢投与は視床下部の外側部分で c-Fos 免疫反応性を有意に増加した。(図 16a、16b)。対照的に、室傍核では c-Fos の免疫反応性に有意差は観察されなかった(図 16a、16c)。延髄の最後野および孤束核においても、c-Fos 免疫反応性細胞が NMU-7005 を投与したマウスで増加していた(図 16a、16d、および 16e)。

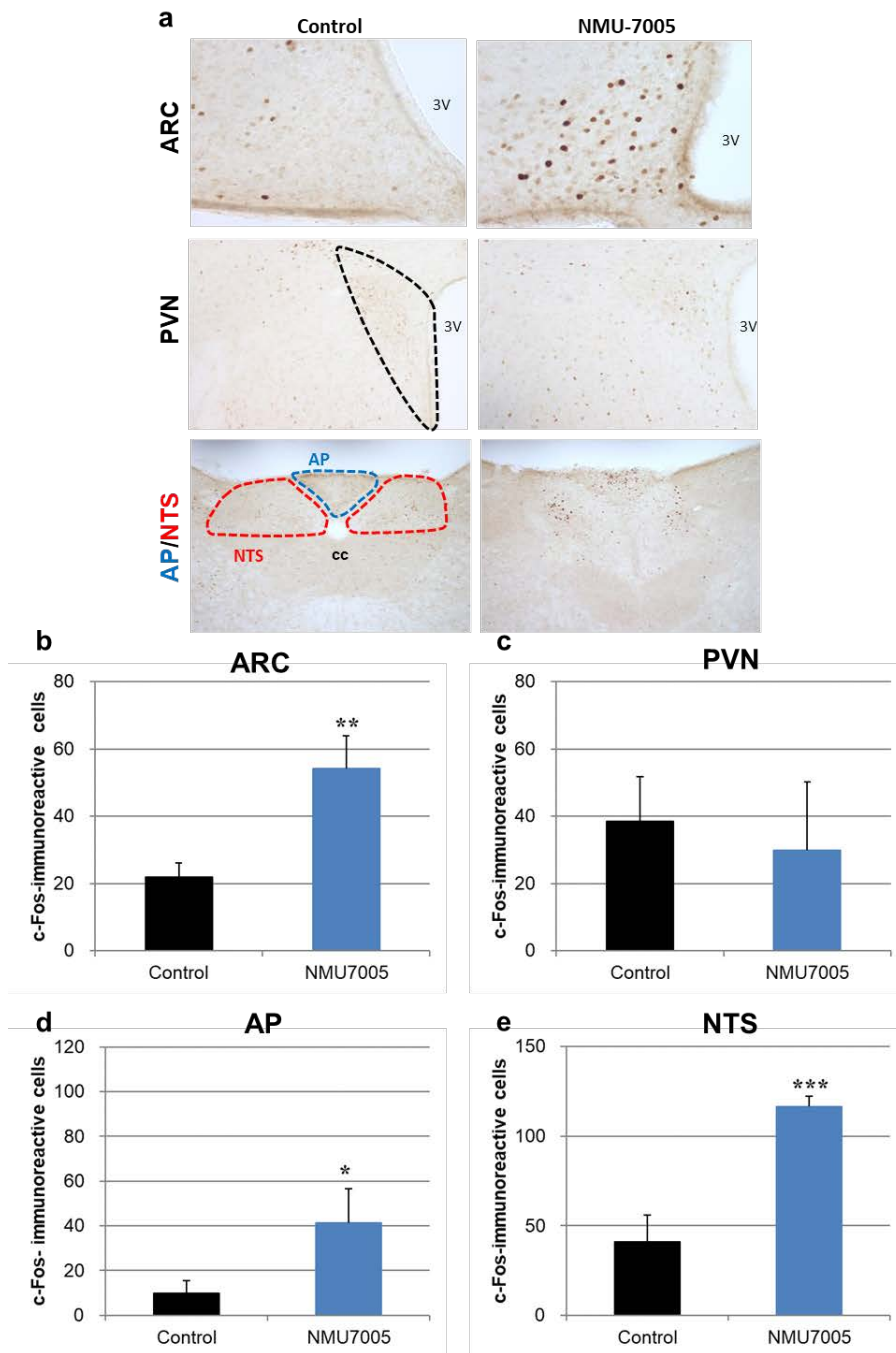


図 16. 投与 4 時間後におけるマウス視床下部あるいは延髄における c-Fos 様免疫反応性
 ビークルあるいは 100 nmol/kg NMU-7005 を皮下投与 4 時間後の(a)マウス視床下部領域の
 弓状核(ARC)と室傍核(PVN)、および延髄最後野(AP)と孤束核(NTS)の免疫組織化学的染色
 像および弓状核(b)、室傍核(c)、最後野(d)、あるいは孤束核(e)における c-Fos 染色の半定
 量スコアリング。各マウスの弓状核、最後野、孤束核、および室傍核から取得したそれぞれ
 12、4、4、5 イメージの平均値で、データは平均値+SD を表す。 * p < 0.05, ** p < 0.01,
 *** p < 0.001, アスピン-ウェルチ t-検定で求めたコントロールに対する有意差。

第 3-3 節 考察

肥満マウスモデルにおける NMUR2 選択的作動薬の末梢投与による薬理学的有効性を評価し、新規の NMUR2 選択的作動薬 NMU-7005 が DIO マウスにおける摂食抑制および脂肪肝の改善を伴う強力な抗肥満効果を示すことを見出した。NMUR2 KO マウスにおいては NMU-7005 単回投与の摂食抑制効果が認められなかったことから、これらの作用は NMUR2 を介することが示唆された。また、NMU-7005 は GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドよりも CTA に対する影響は低かった。NMU-7005 の皮下投与により摂食行動に関連する脳の領域（視床下部弓状核、最後野、および孤束核）における c-Fos 免疫反応性が増加したことから、NMU-7005 の抗肥満効果が CNS の摂食調節を司る神経回路を介して発揮されることが示唆された。内在性 NMU ペプチドは生体内で血中消失半減期が非常に短い ($T_{1/2z} = 5$ 分以内) ため(53)、肥満症に対する NMU 経路を標的とした治療効力に関する研究に際しては、NMU-7005 のような血中安定性の高い NMU 類似体の開発は不可欠である。前述のようにこれまでに、NMUR1 および NMUR2 に対する非選択的作動薬の PEG-(58)、HSA-(59) またはパルミテート(60) コンジュゲート体が報告されており、これらのペプチドは摂食量および体重増加の抑制に対して強力かつ長時間持続的な効力を有し、DIO マウスにおいて摂食抑制作用に基づく抗肥満効果を示した。NMU-7005 による NMUR2 選択的活性化に関する本研究知見と照らし合わせると、これらの研究は NMUR2 の摂食行動調節における重要な寄与と肥満症治療薬としての可能性を示し、且つ NMUR1/R2 を標的とした低分子化合物の開発も有望である可能性を指すものでもある。

NMUR1 と NMUR2 の相対的な寄与を明らかにすることは、最も有望な標的と効果的な治療法を特定する上で重要である。これまで NMU の抗肥満効果についてそれぞれの受容体の生理学的機能の差異を明確にするために、NMUR1 KO

マウスと NMUR2 KO マウスの比較研究が行われてきた。NMU の長期脳室内インフュージョンは NMUR2 KO マウスにおいても有意な体重減少をもたらした(52)ものの、NMU および NMS の中枢投与による摂食抑制および減量効果は主に NMUR2 を介していることが報告されている。一方で、NMU の皮下インフュージョンによる体重低下作用は NMUR1 KO マウスにおいて減弱したことから、NMUR1 の活性化が抗肥満効果を有することを示唆している(53)。さらに、NMUR1/R2 非選択的作動薬である PEG40-NMU は、NMUR1 および NMUR2 それぞれの単一遺伝子 KO マウスにおいて摂食抑制活性を示した。これらの報告は NMUR1 および NMUR2 は NMU を介した抗肥満効果に対して相加的あるいは相乗的に寄与することを示唆している。これらの結果と一致して、第2章で示したように NMUR1 選択的作動薬および NMUR2 選択的作動薬のいずれもが DIO マウスにおいて体重低下作用を示すことを見出した。NMUR1 選択的作動薬は食欲抑制ペプチドである PYY の血中循環レベルを増加させ、食欲亢進ペプチドであるグレリンのレベルを低下させたが、NMUR2 選択的作動薬は効果を示さなかったことから、NMUR2 選択的作動薬の摂食抑制作用は、腸管ホルモン活性とは異なる経路を介して作用すると考えられた。

GLP-1 受容体作動薬は強力な食欲抑制作用とグルコース誘発性インスリン分泌促進作用を示し、リラグルチド(Saxenda®)が肥満症治療薬として承認されている(8)。NMU-7005 とリラグルチドの併用はより強力な摂食抑制を伴う相加的な体重低下効果を示したことから、NMUR2 を介した摂食抑制作用のメカニズムは GLP-1 受容体作動薬のそれとは異なることを示唆している。

体脂肪、特に内臓脂肪蓄積は、インスリン抵抗性の病因の中心に位置すると考えられている(80)。NMU-7005 は肝臓を含む全身の脂肪量を減少させこの時、体重減少と腸間膜脂肪量の間には強い相関が認められ($R^2=0.7217$)、さらに DIO マ

ウスにおいて NMU-7005 は腸間膜脂肪量の減少と並行して肝臓の TG 蓄積を減少させた($R^2 = 0.6786$)ことから、NMU-7005 の体重低下効果の主要な寄与は脂肪量の減少であることを示している。体重低下効果に加えて、NMU-7005 は DIO マウスにおいて T-Cho、ALT、および AST を含む血漿生化学的パラメーターを改善し、さらにおそらくインスリン抵抗性の低下に起因する血漿 IRI の低下が見られ、これらは体重低下がもたらした結果と考えられる。

現行の抗肥満および抗糖尿病治療において、重大な副作用は主要な制限にもなり、別の意味でそれ自体が抗肥満効果の原因となり得るものである。GLP-1 受容体、PYY 受容体、およびニューロペプチド Y2 (Y2R)受容体作動薬を含む多くの食欲を抑制するペプチドは、悪心および嘔吐などの有害な消化器への影響を及ぼすことから、食欲抑制剤が悪心や不快感に基づかないように食欲を低下させるか否か、慎重に薬効を見極める必要がある。嘔吐中枢を欠いているため、げっ歯類における嘔吐作用を評価することはできないので、一般的に CTA 試験が生理活性物質による内臓不快感の誘発を評価するために広く使用されている。これまでに GLP-1 受容体作動薬であるエクセナチドおよび PYY は、げっ歯類モデルにおいて CTA を誘導することが報告されている(81-83)。本研究では、10 nmol/kg のリラグルチドは予想通りに有意な CTA を誘発したが、100 nmol/kg NMU-7005 で処置したマウスは明確な CTA を誘発しなかった。以前の研究では中枢投与された NMU は CTA を誘発しなかったものの、10 mg/kg の NMU を急性に末梢投与した場合は誘発されたことが述べられており(53)、CTA に対する NMU の効果は議論の余地があった。各 NMU 受容体の食欲抑制効果および不快感への寄与を解明するために NMUR1/R2 非選択的、NMUR1 選択的および NMUR2 選択的作動薬の投与を行い、さらなる CTA 試験での比較試験を行うことは興味深い。動物の学習行動からヒトへの影響を予測することは不確実では

あるが、NMUR2 選択的作動薬は GLP-1 受容体作動薬よりもより安全なプロファイルを有するかもしれない。

中枢における NMUR2 作動薬の作用を実証するために、NMU-7005 を投与した C57BL/6J マウスにおける c-Fos 様免疫反応性を評価し弓状核、最後野および孤束核における c-Fos 免疫反応性の増強を見出した。弓状核には 2 つの神経細胞集団である内側に存在する摂食亢進に関わる NPY/AgRP ニューロンおよび外側に存在する食欲抑制に関わる POMC/CART ニューロンが存在することがよく知られている(84)。NMU-7005 投与によって誘発された c-Fos 様免疫反応の増加は弓状核の外側において見られたことから、NMU-7005 による摂食抑制が POMC / CART ニューロンの活性化を介していると推測しているが、これは第 2 章で NMU-2084 を用いた結果からも支持される。今後、細胞および機能特異的な神経マーカーと c-Fos の共染色を実施することにより、NMU-7005 による標的神経回路を理解することが必要であろう。第 2 章でも述べたように室傍核にも NMUR2 が発現しており、NMU の脳室内投与でストレス反応が亢進することが報告されている。NMU の急性脳室内投与によるストレス反応については、前述のようにグルーミング行動が NMUR2 KO マウスでは認められなかった報告(52)と野生型と NMUR2 KO マウスで自発運動と不安に対する反応に差がなかったという報告(55)があり議論の余地があるが、NMU-7005 は室傍核における c-Fos 免疫反応の上昇が見られなかったことから、ストレス反応に対しては影響を与えないと考えられる。延髄最後野および孤束核においても NMU-7005 により c-Fos 免疫反応の上昇が誘発された。最後野は孤束核および迷走神経の背側運動核とともに迷走神経求心性神経線維の主要終結部位であり、摂食調節に関与する背側迷走神経複合体を構成している。NMUR2 は延髄領域に発現していると報告されており(85)、これらの領域は NMU-7005 によって誘導される摂食抑制に対して何

らかの役割を果たすと考えられる。最後野の毛細血管は、血液脳関門を構成するアストロサイトおよび他のグリア細胞によって囲まれていないことが知られており、全身血流中に循環する代謝産物あるいは毒素が通過可能である(86)。弓状核も血液脳関門を欠いている CNS の基底に位置し、循環因子がこの領域にアクセスすることができる(87, 88)。これらのデータおよび NMUR2 が活性化された領域を照らし合わせると、末梢投与された NMUR2 作動薬は、部分的には直接的に弓状核を活性化し、一部は延髄から間接的に活性化されて食欲をコントロールする部位に働いて摂食抑制作用を発揮するのではないかと解釈できる (図 17)。今後の課題として、NMU-7005 による c-Fos の活性化が直接的であるかどうかを決定するために、リラグルチドで明らかにされた手法(89)と同様に放射線または蛍光で標識された NMU-7005 を末梢投与して、c-Fos の活性化誘導が血流を介して直接 NMU-7005 が輸送されたのか、あるいは迷走神経ニューロン活動のような他の経路を介した間接的な作用であるかを明確にする必要があると考えている。NMU-7005 は最後野の c-Fos 免疫反応性細胞の数を増加させたが、CTA を誘発しなかった。最後野は嘔吐の化学受容体トリガーゾーンとしても知られている(90)ので、CTA に対して NMU-7005 が影響を及ぼさなかった理由についてもさらなる研究を必要とすると考えている。

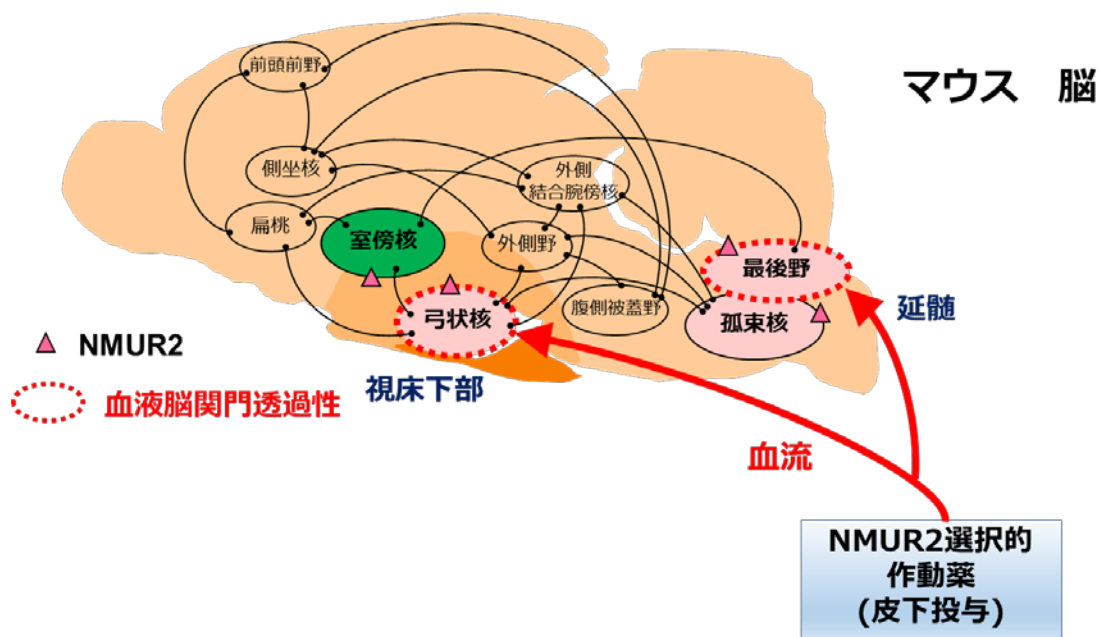


図 17. 末梢投与した NMUR2 選択的作動薬の中枢活性化の推定図

NMUR2 mRNA が発現している領域のうち、c-Fos 免疫反応性が増強した領域をピンク、変化が見られなかった領域を緑で示した。摂食行動に関する神経回路は論文(91)を参照した。

第 3-4 節 結論

要約すると、ここに示された知見は NMUR2 選択的作動薬である NMU-7005 の末梢投与が、摂食に関連した視床下部のニューロンの活性化を介して強力な抗肥満効果を有することを示している。私たちが調べた範囲ではこれらの結果は、前臨床動物モデルにおける NMUR2 選択的作動薬の薬理的効果の最初の詳細な研究成果である。これらのデータは、NMU-7005 および関連化合物が、NMUR2 の生理学的機能の解明のための有益なツールであり、肥満症治療に対して可能性を有することを明確にしたものである。

第4章 結語

新規抗肥満薬の開発を目的として中枢作動性を有する消化管ホルモンに着目し、摂食抑制およびエネルギー代謝亢進による抗肥満作用を有する NMU を新規ターゲットとして研究に着手した。NMU 受容体は NMUR1 と NMUR2 が同定されているが、いずれもが摂食抑制作用を介した抗肥満作用に寄与することから、まず最適な標的受容体を選定するために薬効および有害事象の観点から薬理学的研究を行った。ヒト NMU-25 のアミノ酸配列のうち脊椎動物で完全に保存されている保存領域の C 末端 7 アミノ酸を含む NMU-8 を基に NMUR1/R2 非選択的作動薬、NMUR1 選択的作動薬、NMUR2 選択的作動薬を同定した。

これらのツール化合物を用いて、DIO マウスにおける薬効薬理作用および消化管に対する有害事象を比較検討したところ、NMUR1/R2 非選択的作動薬および NMUR2 選択的作動薬が NMUR1 選択的作動薬よりも優れた抗肥満作用を示し、有害事象の懸念に関しては NMUR2 選択的作動薬が最も小さいことが分かった。従って、薬効と副作用に対してバランスの良い NMU 受容体作動薬としては NMUR2 選択的作動薬が最も有望であると結論付け、NMUR2 を標的受容体とした。

最適化された NMUR2 選択的作動薬である NMU-7005 はマウスにおいて良好な血中安定性を示し、NMU-7005 の皮下への反復投与は DIO マウスにおいて摂食抑制を介した強力な抗肥満効果を認め、この薬効は NMUR2 に作用し CNS の活性化を介していると考えられた。既存の肥満症治療薬であるリラグルチドよりも消化器への副作用が軽減され、リラグルチドと併用による増強効果が期待される。本研究によって創製された新規 NMUR1 選択的および NMUR2 選択的作動薬は、それぞれの受容体を介した生理学的機能の解明のための有益なツールであり、NMU-7005 は肥満治療に対する有望な治療選択肢になり得ると結論

した。

第5章 実験の部

第5-1節 第2章の実験

5-1-1. 動物および飼料

本研究で使用した動物のケア、使用および実験プロトコールは、武田薬品工業（株）の動物実験および使用委員会の承認を受けたものであり、動物研究はARRIVEガイドライン(92)を遵守し、動物の苦痛を最小限に抑え、使用動物数を減らすように努めた。雄性 C57BL/6J マウスは、日本チャールス・リバー株式会社（横浜、日本）または日本クレア株式会社（東京、日本）から購入し、標準げっ歯類飼料(CE-2; 日本クレア株式会社)を与えた。また肥満を誘発するために、5 週齢から試験終了まで HFD（58 kcal% 脂肪; D12331, Surwit's Rodent Diets, Research Diets, Inc. New Brunswick, NJ, USA）を与えた。別段の記載がない限り、動物を自由摂餌と飲水で、温度（20～26℃）および湿度（40～70%）で制御された飼育室で 12 時間の明暗サイクル（07:00 AM. で点灯）の下で個別飼育した。C57BL/6J マウスは耐糖能異常を示し、肥満および糖尿病の研究分野で主に使用されており(93)、HFD 食は長年にわたって肥満を誘発するために使用されている(94)。

5-1-2. ペプチド

PEG 化 NMU-8(64)および PEG 化 NMUR2 選択的作動薬 NMU-2084(65)は武田薬品工業株式会社で合成された。ステアリル化 NMU-8 (NMU-6014)およびパルミチル化 NMUR1 選択的作動薬(NMU-6102)は、標準的フルオレニルメチルオキシカルボニル基の固相合成法を用いて合成した。

5-1-3. NMUR1 あるいは NMUR2 を安定的発現させたチャイニーズハムスター 卵巣細胞株を用いた受容体結合アッセイ

既報の方法に従った(95)。ヒトあるいはマウスの NMUR1 または NMUR2 を安定的に発現させたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(43, 48)から調製した膜画分を用いた。細胞は 10% 牛胎児血清(FBS)含有最小必須培地(MEM)で 5% CO₂ 下、37°Cで培養した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)-EDTA で細胞を剥離し、1,000 g、4°Cで 10 分間遠心後、ホモジナイズバッファー(10 mM NaHCO₃, 5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 10 µg/ml pepstatin A, 20 µg/ml leupeptin, 4 µg/ml E-64, pH 7.4)に懸濁し、ポリトロンホモジナイザー(Kinematica GmbH, Eschbach, Deutschland)で破碎して 1,000 g、4°Cで 10 分間遠心した。さらに 100,000 g、4°Cで 1 時間超遠心分離を行った。得られた沈殿画分をホモジナイズバッファーで懸濁した。CBB protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いてタンパク濃度を定量した。膜画分はアッセイバッファー (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, 0.5 mM PMSF, 10 µg/ml pepstatin A, 20 µg/ml leupeptin, 4 µg/ml E-64, pH 7.4)で希釈し、72 pM の ¹²⁵I-NMU および様々な濃度の非標識ペプチドを加えて 25°Cで 1 時間インキュベートした。反応は 1.5 ml のろ過バッファー(20 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.1% CHAPS, pH 7.4)を添加して停止し、予めポリエチレンイミン(PEI) 溶液 (20 mM Tris, 0.3% PEI, pH 7.4)で洗浄した Whatman® GF/F glass fiber filters (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を用いて真空下で急速ろ過した。フィルターの放射活性を γ-counter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)を用いて測定した。データは GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, CA, USA)を用いて IC₅₀ 値を算出した。

5-1-4. NMUR1 あるいは NMUR2 を安定的発現させた CHO 細胞株を用いた細胞内 Ca²⁺濃度アッセイ

ヒトあるいはマウスの NMUR1 または NMUR2 を安定的に発現させた CHO 細胞を、透明な底の 384 ウェル黒色プレート(Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)上に播種した (1×10⁴ 細胞/ウェル)。10%透析 FBS (Gemini Bio-Products, Sacramento, CA, USA) と 50 µg/ml ゲンタマイシン(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を含む MEM-α (和光純薬株式会社、大阪、日本) 中で 5% CO₂ 下、37°Cで一晩培養した後、細胞に 0.1%脂肪酸非含有 BSA (和光純薬) とカルシウム感受性蛍光色素[Calcium Kit-Fluo-4 (同仁化学研究所、熊本、日本)]を加え、15 分間 37°C で保温した。さらに、プレートを Fluorometric imaging plate reader (FLIPR)スクリーニングシステム(FLIPR Tetra, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)に移し、種々の用量のペプチドまたは 1 µM のブタ NMU-8 (BACHEM, Bubendorf, Switzerland)を細胞に添加した。3 分間の蛍光強度の変化を作動薬刺激による細胞内 Ca²⁺濃度の変化の指標としてとらえ、データを FLIPR ソフトウェアで分析した。試験ペプチドの相対活性は、試験ペプチドで処理した蛍光強度を W、ビークル(0.1% DMSO)処理の蛍光強度を X、1 µM のブタ NMU-8 で処理した蛍光強度を Y として[(W-X)/(Y-X)]×100 で求めた。EC₅₀ 値は、Prism 5 によって計算した。

5-1-5. 血中指標の測定

血漿グルコース (PG)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-Cho)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、およびアラニントランスアミナーゼ (ALT)は酵素法により 7080 形自動分析装置 (HITACHI、東京、日本) を用い

で測定した。糖化ヘモグロビン (GHb) は、アフィニティーカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法により、自動グリコヘモグロビン分析計 HCL-723G7 (東ソー、東京、日本) を用いて測定した。免疫反応性インスリン(IRI)は Rat insulin RIA Kit (LINCO Research, St.Charles, MO, USA) を用いて測定した。

5-1-6. DIO マウスを用いた 2 週間反復投与試験

雄性 C57BL/6 マウスは 36 あるいは 35 週齢より個別飼育し、ハンドリングと皮下投与に馴らせるために 7 日間馴化投与を行った。体重、摂餌量および生化学パラメーターの平均値がほぼ均等になるように、無作為に各群 6 匹ずつ群分けした。一日一回夕方に、 ビークル[10% DMSO/生理食塩水 (大塚、徳島、日本)]、NMU-0002 (10, 30 nmol/kg/2 ml)、 NMU-6014 (300, 1000 nmol/kg/2 ml) 、NMU-6201 (50, 150 nmol/kg/2 ml)あるいは NMU-2084 (30, 100, 300 nmol/kg/2 ml) を 13 日間背部皮下に投与した。体重および摂餌量は原則として毎日測定した。下痢の判断基準は、糞便の形状はしているがすぐに形がくずれる程度に柔らかいものを軟便、液状ではないが糞便の形状を保てないほど水分を含んでいるものを下痢、糞便が完全な液状で形を整えていないものを水様便としこれらを総合して下痢と判断した。

5-1-7. 薬物動態

NMU-0002 (10 nmol/kg)、NMU-6014 (50 nmol/kg)、NMU-6102 (300 nmol/kg)、または NMU-2084 (10 nmol/kg)を雄性 C57BL/6J マウス (8 または 9 週齢) に単回で投与した。血液サンプルを 0~48 時間で採取し、遠心分離後血漿を得た。血漿サンプルをメタノールまたはアセトニトリルを用いて除タンパクを行った。遠心分離後、上清を LC / MS / MS システム(API5000; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて分析し、化合物の血漿濃度を決定した。 NMU-0002 および

NMU-2084 を投与した動物から得られた血漿サンプルについては、除タンパク後に上清を 96 ウェルマイクロプレートに移し、窒素ガス下で蒸発乾固させた。アセトニトリルおよび蒸留水の混合液で再溶解して、LC/MS/MS システムを用いて化合物の血漿濃度を決定した。薬物動態パラメーターは、モーメント分析法を用いて計算し、内部標準化合物に対する正規化用量値として表した。

5-1-8. c-Fos 免疫組織化学

CE-2 食を与えた雄性 C57BL/6J マウス (9 または 12 週齢) を個別飼育し、7 日間ハンドリングおよび腹腔内投与に馴らせるために馴化投与を行った。体重の平均が均一になるように無作為に群分けし、25 時間絶食させた。ビークル (10% DMSO/生理食塩水)、NMU-0002 (10, 30 nmol/kg) または NMU-6014 (100, 300 nmol/kg) を単回で腹腔内投与した。別実験として、ビークル (10% DMSO/生理食塩水)、NMU-6102 (300, 1000 nmol/kg) または NMU-2084 (300, 1000 nmol/kg) を単回で腹腔内投与した。3 時間後、動物を過剰のペントバルビタールで麻酔後解剖し、脳を採取して、マイルドフォルム 10N (和光純薬) 中で 4°C 下、一晚固定し、30% スクロース含有 PBS を用いて凍結を防御した。次いで、脳を Tissue-Tek® O.C.T コンパウンド (サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日本) で包埋、凍結し、各脳領域 (孤束核、最後野、弓状核、および室傍核) の 40 μm 厚の冠状切片を作製した。孤束核および最後野の切片を 1 : 1000 で希釈したウサギ抗 c-Fos 抗体 (カタログ番号 sc-52; Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA) と共にインキュベートし、弓状核および室傍核の切片は *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) (方法は以下に記載) 後、1 : 4000 で希釈したウサギ抗 c-Fos 抗体 (カタログ番号 sc-253; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) でインキュベートし、c-Fos 検出のために VECTASTAIN Elite ABC キット (カタログ番号 PK-6101;

Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA) および ImmPACT ジアミノベンジン (カタログ番号 SK-4105; Vector Laboratories Inc.) を用いて検出した。全ての工程は、free-floating 法で行った。切片を載せ、光学顕微鏡(Axioimager M1; Carl Zeiss, Munich, Germany)および/または NanoZoomer (Hamamatsu Photonics、浜松、日本) で弓状核および室傍核は 20 倍、孤束核および最後野は 10 倍の対物レンズを用いて、画像を取得した。

5-1-9. Pomc に対する *in situ*ハイブリダイゼーション (ISH)

Pomc 遺伝子の cDNA 断片を PCR より得て、pCR-Blunt II-TOPO ベクター (K280020; Invitrogen)にサブクローニングした。このプラスミドを鋳型として SP6/T7 転写キット(1175025; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて、digoxigenin (DIG)標識リボプローブ(Pomc)を *in vitro* 転写により作製した。ISH は全ての工程を free-floating 法で行った。弓状核の冠状切片 (40 μ m 厚、上記記載) はアセチル化した後、60°Cで DIG 標識リボプローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液中で一晩インキュベートした。ハイブリダイゼーション後切片を洗浄し、1:1000 で希釈したアルカリホスファターゼ結合抗 DIG 抗体 (カタログ番号 11093274910; Roche Diagnostics) と 37°Cで 2 時間インキュベートし、次いで 4-ニトロブルー-テトラゾリウムクロライドおよび 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイル-リン酸を含む色素原溶液を用いて可視化した。PBS ですすいだ後、切片は上記記載通りに c-Fos で共染色した。

5-1-10. 神経解剖学的定量分析

弓状核については、Pomc mRNA 陽性ニューロン中の c-Fos 陽性細胞数をマニュアルでカウントした。データは、Pomc mRNA 陽性ニューロン中の c-Fos 陽性細胞の%で示した。孤束核および最後野については、c-Fos 陽性細胞の数を、イ

イメージ J ソフトウェア(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて自動計数した。孤束核の c-Fos 陽性細胞の数は、孤束核と最後野領域の総数からマニュアルで決定した最後野における数を差し引きして求めた。室傍核における c-Fos 陽性細胞の数は、イメージ J を用いて手動で計数した。データは領域当たりの c-Fos 免疫反応性細胞の数として表記した。

5-1-11. C57BL/6J マウスを用いたホルモン分泌へ及ぼす作用

C57BL/6J マウスは、8 日間背部皮下に生理食塩水を馴化投与し、9 週齢で試験に供した。体重、摂餌量、体重変化の平均値が均等になるように各群 6 匹ずつ 5 群に群分けした。採血の 4 時間前に、NMU-0002 (100 nmol/kg/2 ml)、NMU-6014 (500 nmol/kg/2 ml)、NMU-6102 (3000 nmol/kg/2 ml)、あるいは NMU-2084 (3000 nmol/kg/2 mL)を背部皮下に投与した。ビークルは 10% DMSO/生理食塩水を用いた。無麻酔下において、眼窩静脈叢から採血を行い遠心後、血漿を得た。血漿 PYY 濃度は、Rat/Mouse PYY RIA Kit (Merck Millipore, Burlington, MA, USA)を用いて測定した。また、血漿 des-acyl ghrelin 濃度および血漿 cholecystokinin (CCK) 濃度は、それぞれ Desacyl-Ghrelin ELISA Kit (SCETI)および CCK (26-33) (Non-Sulfated) (Human, Rat, Mouse) - EIA Kit (いずれも Phoenix Pharmaceuticals, Mannheim, Germany)を用いて測定した。

5-1-12. マウスを用いた血漿コルチコステロン測定

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに NMU-0002 (10, 30, 100 nmol/kg)または NMU-2084 (300, 1000 nmol/kg)を腹腔内投与し、3 時間後に血液サンプルをアプロチニンおよび EDTA を抗凝固剤として採取した。血液サンプルを遠心分離し、コルチコステロン EIA キット (YK240、谷内原研究所、静岡、日本)を用いて測定した。

5-1-13. 統計

データおよび統計分析は、薬理学における実験計画および分析に関する推奨事項(96)に従った。データは平均値と標準偏差(SD)で示した。

ポストホックダネットの多重比較検定を用いて一元配置分散分析(ANOVA)を用いて統計的有意性を分析し、 $p < 0.05$ の差を有意とみなした。ポストホックテストは、Fが $P < 0.05$ を達成したときのみ実施した。SAS システムバージョン 8.2 (SAS Institute Japan、東京、日本) または EXSUS バージョン 8.0 (CAC Croit Corporation、東京、日本) を用いて分析を行った。

第 5 - 2 節 第 3 章の実験

5-2-1. ペプチドおよび材料

新規 NMUR2 選択的作動薬である NMU-7005; 分子量 20kDa (PEG20k)-ピペラジン-1-イルアセチル(PipAc)-Tyr-3-(2-ナフチル)アラニン[Nal(2)]-Leu-Phe-Arg-Pro-Arg-Asn-NH₂ および NMU-8 (Tyr-Phe-Leu-Phe-Arg-Phe-Arg-Asn-NH₂) は武田薬品工業株式会社で合成した。ヒト NMU-25 は、ペプチド研究所 (大阪、日本) から購入した。リラグルチド(Victoza®)は Novo Nordisk Pharma Ltd. (東京、日本) から購入した。他の全ての化学物質は分析グレードのものを和光純薬工業から購入した。

5-2-2. NMUR1 あるいは NMUR2 を安定的発現させた CHO 株を用いた細胞内 Ca²⁺濃度アッセイ

ヒトあるいはマウスの NMUR1 または NMUR2 を安定的に発現させた CHO 細胞を、透明な底の 384 ウェル黒色プレート上に播種した (1×10⁴ 細胞/ウェル)。10%透析 FBS と 50 µg/ml ゲンタマイシンを含む MEM-α 中で 5% CO₂ 下、37°C で一晩培養した後、細胞に 0.1%脂肪酸非含有 BSA と Calcium Kit-Fluo-4 を加え、

15 分間 37°C で保温した。さらに、プレート を FLIPR Tetra に移し、種々の用量のペプチド または 1 μM のブタ NMU-8 を細胞に添加した。3 分間の蛍光強度の変化を 作動薬刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化の指標としてとらえ、データを FLIPR ソフトウェアで分析した。試験ペプチドの相対作動薬活性は、試験ペプチドで処理した蛍光強度を W、ビークル(0.1% DMSO)処理の蛍光強度を X、1 μM のブタ NMU-8 で処理した蛍光強度を Y として $[(W-X)/(Y-X)] \times 100$ で求めた。EC50 値は、Prism 5 によって計算した。

5-2-3. 動物および飼料

本研究で使用した動物のケアおよび使用、および実験プロトコールは武田薬品工業(株)の動物実験および使用委員会の承認を受けたものである。雄性 C57BL/6J マウスは日本チャールス・リバー株式会社または日本クレア株式会社から購入した。NMUR2 ノックアウトマウスは、Taconic / 日本クレアから購入した。肥満を誘導するために、C57BL / 6J マウスに、5 週齢から試験終了まで、HFD (D12331)を与えた。別段の記載がない限り、動物は自由摂餌および飲水で飼育し、温度(20~26°C)および湿度(40~70%)制御された飼育室(07:00 AM. に点灯)で、12 : 12 時間明/暗サイクルで維持した。

5-2-4. 薬物動態

NMU-7005 (30 nmol/kg)を雄の DIO-C57BL/6J マウス(43 週齢)に 1 日 1 回 14 日間皮下投与した。1 日目および 14 日目に血漿サンプルを得て、NMU-7005 の血漿濃度を測定した。5 μl のメタノール/蒸留水(9 : 1, v/v)、5 μl の内部標準(アセトニトリル溶解、10 ng/ml)、および 300 μl のメタノールを 50 μl の血漿に添加した。5 分間混合した後、5 分間 4°C 下、5,250 rpm で遠心分離した。上清(275 μl)を 96 穴マイクロプレートに移し、1.5 時間蒸発乾固させ、乾燥残渣を 90 μl の

メタノール/蒸留水(9 : 1, v/v)に溶解した。5 分間混合し、遠心分離 (5,250 rpm、3 分、4°C) 後、一定量の試料を LC / MS / MS システムに注入して、NMU-7005 の血漿濃度を測定した。

5-2-5. 雄性 DIO-C57BL/6J マウスにおける NMUR2 選択的作動薬 NMU-7005 の 4 週間の反復投与

31 週齢の雄性 DIO マウスを個別飼育でハンドリングおよび皮下投与に対する馴化投与を 7 日間行った。マウスを体重、摂餌量、IRI および TG レベルの平均値が同一になるように無作為に 4 群に群分けを行った(n=6)。マウスの体重を測定し、暗期の約 2 時間前に生理食塩水または NMU-7005 (10, 30, 100 nmol/kg)を皮下投与し、事前に秤量した餌を与えた。摂餌量および体重を試験期間中は原則として毎日測定した。体組成分析装置 EchoMRI-900 (日立アロカメディカル株式会社、東京、日本) により、測定モード Primary Accumulation 1T3 で経時的に体脂肪量および除脂肪量を測定した。試験最終日に動物を麻酔下で屠殺後解剖し、肝臓および脂肪組織重量を測定した。

5-2-6. 血漿パラメーター測定

反復投与前後の全動物について PG、T-Cho、TG、AST、および ALT レベルをそれぞれ生化学自動分析装置を用いて測定した。マウスインスリン ELISA キット (AKRIN-011; シバヤギ、群馬、日本) を用いて IRI レベルの定量を行った。血液中の GHb レベルは、HCL-723G7 を用いた HPLC 法によって測定した。肝臓 TG 含有量を以下のように測定した：組織片を生理食塩水中でホモジナイズし、ヘキサン：イソプロパノール(3 : 2)溶液を添加し脂質を抽出した。脂質相を回収し、乾燥後イソプロパノールに溶解した。TG 濃度の測定は、トリグリセリド E 試験 (和光純薬) を用いて行った。

5-2-7. NMUR2 KO マウスにおける摂食および体重に対する NMU-7005 および リラグルチドの単回投与の影響

全部で 48 匹の野生型または 42 匹の NMUR2 KO 雄マウス（13 週齢）を個別飼育し、5 日間馴化投与を行った。マウスを体重および摂餌量の平均が均一となるように 3 群に無作為に分け(n=8)、ビークル（生理食塩水）、リラグルチド(100 nmol/kg)または NMU-7005 (300 nmol/kg)を明暗サイクルの暗期の開始 2 時間前に皮下投与し、予め秤量した餌を与えた。残餌量を投与 18 時間後に秤量し、体重を投与 19 時間後に測定した。

5-2-8. 条件付け味覚嫌悪(CTA)試験

雄性 C57BL/6J マウス（7 週齢）を 2 時間/日の時間制限給水および生理食塩水の皮下注射に馴らせるために 1 週間馴化投与を行った。マウスを体重および飲水量の平均が均一になるように 5 群に分けた(n=7)。CTA 試験は以下のプロトコルに従って行った。1 日目に第 1 回目のコンディショニングとして、マウスに 0.1%サッカリンナトリウム溶液を与えた 10 分後に各化合物を皮下投与し、2 時間給水した。2 日目に生理食塩水を皮下注射して 10 分後に水道水を 2 時間与え、3 日目に第 2 回目のコンディショニングを 1 日目と同じ手順を用いて行った。4 日目に、マウスに皮下注射をせずに 2 時間水道水を与えた。5 日目に、水道水およびサッカリンナトリウム溶液の両方を皮下注射せずに 2 時間供給し、それぞれの溶液の摂取量を測定した。[(サッカリン溶液摂取量/サッカリン溶液摂取量+水道水摂取量)]×100 に従って、サッカリン嗜好率(%)を算出した。

5-2-9. DIO マウスを用いたリラグルチドとの共投与あるいは非共投与における NMU-7005 の 2 週間反復投与の摂食抑制効果の検討

試験 1 週間前に 39 週齢の雄性 DIO マウスを個別飼育し、馴化投与を行った。マウスを体重、摂餌量、および血漿 IRI および TG レベルの平均値が均一になるように 4 群に無作為に群分けした(n=6)。マウスに自由摂餌で餌を与え、生理食塩水、30 nmol/kg NMU-7005 単独群、10 nmol/kg リラグルチド単独群、または NMU-7005 (30 nmol/kg)とリラグルチド(10 nmol/kg)の共投与群で、暗期の約 2 時間前にそれぞれの化合物を 2 週間皮下注射した。試験期間中に摂餌量および体重を測定した。

5-2-10. 視床下部および延髄における c-Fos 免疫反応に対する末梢 NMU-7005 投与の影響

雄性 C57BL/6J マウス (9 週齢) に明期で、100 nmol/kg NMU-7005 または生理食塩水のいずれかを皮下投与した(n=4)。4 時間後、過剰量のペントバルビタールを腹腔内注射しマウスを安楽死させた。続いて脳を取り出し、4% パラホルムアルデヒドに浸漬固定し、4°Cで保存した。30% スクロース含有 PBS で置換した後、組織を Tissue-Tek®O.C.T コンパウンドで包埋し、-80°Cで凍結させた。凍結したブロックをスレッジマイクロトームで切断し、厚さ 40 μm の切片を作製した。内在性ペルオキシダーゼ活性を失活させるために、切片を 1% 過酸化水素で 20 分間インキュベートした。切片を PBS で洗浄し、0.4% Triton X-100 および 1% 正常ウマ血清 (ブロッキング溶液) を含有するリン酸緩衝液中で 60 分間ブロックし、次に 1 : 2000 で希釈したウサギ抗 c-Fos 抗体 (カタログ番号 sc-52; Santa Cruz Biotechnology) を含むブロッキング溶液中で 25°C下、一晚インキュベートした。切片を PBS で洗浄し、ブロッキング溶液で 1 : 300 に希釈したビオチ

ン標識抗ウサギ IgG 抗体(VECTOR Laboratories)で 2 時間インキュベートした。VECTASTAIN®ABC ウサギ IgG キット (カタログ番号 PE-6101; VECTOR Laboratories) を用いて c-Fos の免疫反応性を検出した。群間で一致した部分で、視床下部の核および延髄における c-Fos 陽性細胞の総数をブラインドで計数した。

5-2-11. 統計

他に指示がない限り、値は平均±SD として示した。統計解析は、SAS システムバージョン 8.2、EXSUS バージョン 8.0 または GraphPad Prism 7 (エムデーエフ、東京、日本) を用いて行った。スチューデントの t 検定、アスピン・ウェルチの t 検定、またはダネット多重比較検定を用いてデータを分析した。p < 0.05 を有意と判定した。コントロールに対するペプチドの用量依存性効力は、片側ウィリアムズ検定によって評価し、p < 0.025 を有意と判定した。図 15c に示す NMU-7005 とリラグルチドとの間の相乗的または相加的な相互作用を調べるために、二元配置 ANOVA を用いた(97)。

謝辞

終わりに鑑み、本博士論文の作成、審査にあたり、終始懇切な御指導と御助言を賜りました北里大学薬学部衛生化学教室教授 今井浩孝博士、創薬物理化学教室教授 広野修一博士、生薬学教室教授 小林義典博士、薬理学教室教授 田辺光男博士に心より御礼申し上げます。

本研究の機会を与えてくださいました、武田薬品工業株式会社元医薬研究本部本部長 小高裕之博士に感謝いたします。本研究は旧循環代謝創薬ユニット副ユニット長 山田幸男博士、旧リサーチマネージャー 野田正邦博士の御指導のもとに遂行されたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

本研究の薬効薬理試験に多大なご協力とご指導を賜りました旧循環代謝創薬ユニット主席研究員 竹河志郎氏、リサーチニューロサイエンス創薬ユニット主任研究員 永井宏彰博士、旧循環代謝創薬ユニット主任研究員 浅川智子氏、リサーチ再生医療創薬ユニット主任研究員 鈴木紀子氏、旧循環代謝創薬ユニット主任研究員 土森和恵氏、旧先端技術研究所主席研究員 大瀧徹也博士、旧基盤技術研究所主任研究員 横山孝太郎博士、旧生物分子研究所主席研究員 井ノ岡博博士、旧開拓研究所研究員 野口次郎氏に深謝いたします。本研究の合成を担当いただきました旧化学研究所所長 内川治博士、旧主席研究員 浅見泰司博士、旧主任研究員 西澤直城博士、旧研究員 兼松陽子氏、合成のご助言と御指導をいただきました旧循環代謝創薬ユニットリサーチマネージャー 前川毅志博士に深謝いたします。本研究の *in vitro* 活性測定をご担当いただきました旧生物分子研究所主席研究員 坂本潤一氏、旧主任研究員 土手克子氏、薬物動態試験をご担当いただきましたリサーチ薬物動態研究所主任研究員 藤田央氏、同主任研究員 松宮浩太氏に感謝いたします。また、研究遂行にあたり重要なフィードバックをいただいたリサーチニューロサイエンス創薬ユニット主任

研究員 丸山穰博士に感謝いたします。

透明性と科学的厳密さの宣言

研究支援に携わる資金提供機関、研究機関が推奨する前臨床研究の透明性の高い報告および科学的厳密性の原則に則っていることを宣言します。

引用論文

1. WHO. Fact Sheets detail Obesity and Overweight World Health Organization; 2018 [updated 16 February 2018. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
2. NIH. The Practical Guideline Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults: National Institutes of Health; 2000 [Available from: https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/prctgd_c.pdf.
3. Heymsfield SB, Cefalu WT. Does body mass index adequately convey a patients mortality risk? JAMA. 2013;309(1):87-8.
4. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. The Lancet. 2014;384(9945):766-81.
5. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. Diabetes Research and Clinical Practice. 2014;103(2):137-49.
6. Shaw J, Sicree RA, Zimmet PZ. Global Estimates of the Prevalence of Diabetes for 2010 and 2030. 2009. 4-14 p.
7. Bray GA. Why do we need drugs to treat the patient with obesity? Obesity. 2013;21(5):893-9.
8. Daneschvar HL, Aronson MD, Smetana GW. FDA-Approved Anti-Obesity Drugs in the United States. The American journal of medicine. 2016;129(8):879.e1-6.
9. FUJIFILM. Sanorex Tablets. 2014.
10. Gloy VL, Briel M, Bhatt DL, Kashyap SR, Schauer PR, Mingrone G, et al.

Bariatric surgery versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ : British Medical Journal*. 2013;347.

11. L S. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *Journal of Internal Medicine*. 2013;273(3):219-34.

12. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today*. 2015;20(1):122-8.

13. K. MA, G. MK. Gut hormones: the future of obesity treatment? *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2012;74(6):911-9.

14. Pucci A, Batterham RL. Mechanisms underlying the weight loss effects of RYGB and SG: similar, yet different. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2018.

15. Srivastava G, Apovian C. Future Pharmacotherapy for Obesity: New Anti-obesity Drugs on the Horizon. *Current Obesity Reports*. 2018;7(2):147-61.

16. Campbell Jonathan E, Drucker Daniel J. Pharmacology, Physiology, and Mechanisms of Incretin Hormone Action. *Cell Metabolism*. 2013;17(6):819-37.

17. Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*. 2006;444:854.

18. Hay DL, Chen S, Lutz TA, Parkes DG, Roth JD. Amylin: Pharmacology, Physiology, and Clinical Potential. *Pharmacol Rev*. 2015;67(3):564-600.

19. Sasaki T, Matsui S, Kitamura T. Control of Appetite and Food Preference by NMDA Receptor and Its Co-Agonist d-Serine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(7):1081.

20. Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin U-8 and U-25: novel uterus stimulating and hypertensive peptides identified in porcine spinal cord. *Biochemical and*

biophysical research communications. 1985;130(3):1078-85.

21. Minamino N, Sudoh T, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedins: novel smooth-muscle stimulating peptides identified in porcine spinal cord. *Peptides*. 1985;6 Suppl 3:245-8.
22. Brighton PJ, Szekeres PG, Willars GB. Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles. *Pharmacol Rev*. 2004;56(2):231-48.
23. Mitchell JD, Maguire JJ, Davenport AP. Emerging pharmacology and physiology of neuromedin U and the structurally related peptide neuromedin S. *Br J Pharmacol*. 2009;158(1):87-103.
24. Nakashima Y, Ida T, Sato T, Nakamura Y, Takahashi T, Mori K, et al. Neuromedin U is necessary for normal gastrointestinal motility and is regulated by serotonin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1200:104-11.
25. Domin J, Ghatei MA, Chohan P, Bloom SR. Neuromedin U--a study of its distribution in the rat. *Peptides*. 1987;8(5):779-84.
26. Mitchell JD, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Expression and vasoconstrictor function of anorexigenic peptides neuromedin U-25 and S in the human cardiovascular system. *Cardiovascular research*. 2009;81(2):353-61.
27. Martinez VG, O'Driscoll L. Neuromedin U: a multifunctional neuropeptide with pleiotropic roles. *Clin Chem*. 2015;61(3):471-82.
28. Kaczmarek P, Malendowicz LK, Pruszyńska-Oszmalek E, Wojciechowicz T, Szczepankiewicz D, Szkudelski T, et al. Neuromedin U receptor 1 expression in the rat endocrine pancreas and evidence suggesting neuromedin U suppressive effect on insulin secretion from isolated rat pancreatic islets. *International journal of molecular medicine*. 2006;18(5):951-5.

29. Kaczmarek P, Malendowicz LK, Fabis M, Ziolkowska A, Pruszyńska-Oszmalko E, Sassek M, et al. Does somatostatin confer insulinostatic effects of neuromedin U in the rat pancreas? *Pancreas*. 2009;38(2):208-12.
30. Alfa RW, Park S, Skelly KR, Poffenberger G, Jain N, Gu X, et al. Suppression of insulin production and secretion by a incretin hormone. *Cell Metab*. 2015;21(2):323-34.
31. Klose CSN, Mahlakoiv T, Moeller JB, Rankin LC, Flamar AL, Kabata H, et al. The neuropeptide neuromedin U stimulates innate lymphoid cells and type 2 inflammation. *Nature*. 2017;549(7671):282-6.
32. Cardoso V, Chesne J, Ribeiro H, Garcia-Cassani B, Carvalho T, Bouchery T, et al. Neuronal regulation of type 2 innate lymphoid cells via neuromedin U. *Nature*. 2017;549(7671):277-81.
33. Wallrapp A, Riesenfeld SJ, Burkett PR, Abdulnour RE, Nyman J, Dionne D, et al. The neuropeptide NMU amplifies ILC2-driven allergic lung inflammation. *Nature*. 2017;549(7672):351-6.
34. Hainerova I, Torekov SS, Ek J, Finkova M, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, et al. Association between neuromedin U gene variants and overweight and obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(12):5057-63.
35. Howard AD, Wang R, Pong SS, Mellin TN, Strack A, Guan XM, et al. Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature*. 2000;406(6791):70-4.
36. Nakazato M, Hanada R, Murakami N, Date Y, Mondal MS, Kojima M, et al. Central effects of neuromedin U in the regulation of energy homeostasis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;277(1):191-4.

37. Kowalski TJ, Spar BD, Markowitz L, Maguire M, Golovko A, Yang S, et al. Transgenic overexpression of neuromedin U promotes leanness and hypophagia in mice. *J Endocrinol.* 2005;185(1):151-64.
38. Hanada R, Teranishi H, Pearson JT, Kurokawa M, Hosoda H, Fukushima N, et al. Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nat Med.* 2004;10(10):1067-73.
39. Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Jethwa PH, Kennedy AR, Murphy KG, et al. Hypothalamic actions of neuromedin U. *Endocrinology.* 2002;143(11):4227-34.
40. Hanada T, Date Y, Shimbara T, Sakihara S, Murakami N, Hayashi Y, et al. Central actions of neuromedin U via corticotropin-releasing hormone. *Biochemical and biophysical research communications.* 2003;311(4):954-8.
41. Mori K, Miyazato M, Ida T, Murakami N, Serino R, Ueta Y, et al. Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *The EMBO journal.* 2005;24(2):325-35.
42. Ida T, Mori K, Miyazato M, Egi Y, Abe S, Nakahara K, et al. Neuromedin S Is a Novel Anorexigenic Hormone. *Endocrinology.* 2005;146(10):4217-23.
43. Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Habata Y, Hinuma S, et al. Identification of neuromedin U as the cognate ligand of the orphan G protein-coupled receptor FM-3. *J Biol Chem.* 2000;275(28):21068-74.
44. Hedrick JA, Morse K, Shan L, Qiao X, Pang L, Wang S, et al. Identification of a Human Gastrointestinal Tract and Immune System Receptor for the Peptide Neuromedin U. *Molecular pharmacology.* 2000;58(4):870-5.
45. Kojima M, Haruno R, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Hanada R, et al. Purification and identification of neuromedin U as an endogenous ligand for an orphan

receptor GPR66 (FM3). *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;276(2):435-8.

46. Raddatz R, Wilson AE, Artymyshyn R, Bonini JA, Borowsky B, Boteju LW, et al. Identification and characterization of two neuromedin U receptors differentially expressed in peripheral tissues and the central nervous system. *J Biol Chem*. 2000;275(42):32452-9.

47. Szekeres PG, Muir AI, Spinage LD, Miller JE, Butler SI, Smith A, et al. Neuromedin U is a potent agonist at the orphan G protein-coupled receptor FM3. *J Biol Chem*. 2000;275(27):20247-50.

48. Hosoya M, Moriya T, Kawamata Y, Ohkubo S, Fujii R, Matsui H, et al. Identification and functional characterization of a novel subtype of neuromedin U receptor. *J Biol Chem*. 2000;275(38):29528-32.

49. Shan L, Qiao X, Crona JH, Behan J, Wang S, Laz T, et al. Identification of a novel neuromedin U receptor subtype expressed in the central nervous system. *J Biol Chem*. 2000;275(50):39482-6.

50. Brighton PJ, Szekeres PG, Wise A, Willars GB. Signaling and ligand binding by recombinant neuromedin U receptors: evidence for dual coupling to Galphaq/11 and Galphai and an irreversible ligand-receptor interaction. *Molecular pharmacology*. 2004;66(6):1544-56.

51. Graham ES, Turnbull Y, Fotheringham P, Nilaweera K, Mercer JG, Morgan PJ, et al. Neuromedin U and Neuromedin U receptor-2 expression in the mouse and rat hypothalamus: effects of nutritional status. *Journal of Neurochemistry*. 2003;87(5):1165-73.

52. Peier A, Kosinski J, Cox-York K, Qian Y, Desai K, Feng Y, et al. The antiobesity

effects of centrally administered neuromedin U and neuromedin S are mediated predominantly by the neuromedin U receptor 2 (NMUR2). *Endocrinology*. 2009;150(7):3101-9.

53. Peier AM, Desai K, Hubert J, Du X, Yang L, Qian Y, et al. Effects of peripherally administered neuromedin U on energy and glucose homeostasis. *Endocrinology*. 2011;152(7):2644-54.

54. Dalbøge LS, Pedersen SL, Secher T, Holst B, Vrang N, Jelsing J. Neuromedin U inhibits food intake partly by inhibiting gastric emptying. *Peptides*. 2015;69:56-65.

55. Zeng H, Gragerov A, Hohmann JG, Pavlova MN, Schimpf BA, Xu H, et al. Neuromedin U receptor 2-deficient mice display differential responses in sensory perception, stress, and feeding. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(24):9352-63.

56. Benzon CR, Johnson SB, McCue DL, Li D, Green TA, Hommel JD. Neuromedin U receptor 2 knockdown in the paraventricular nucleus modifies behavioral responses to obesogenic high-fat food and leads to increased body weight. *Neuroscience*. 2014;258:270-9.

57. McCue DL, Kasper JM, Hommel JD. Regulation of motivation for food by neuromedin U in the paraventricular nucleus and the dorsal raphe nucleus. *Int J Obes (Lond)*. 2017;41(1):120-8.

58. Ingallinella P, Peier AM, Poci A, Marco AD, Desai K, Zytka K, et al. PEGylation of Neuromedin U yields a promising candidate for the treatment of obesity and diabetes. *Bioorg Med Chem*. 2012;20(15):4751-9.

59. Neuner P, Peier AM, Talamo F, Ingallinella P, Lahm A, Barbato G, et al. Development of a neuromedin U-human serum albumin conjugate as a long-acting candidate for the treatment of obesity and diabetes. Comparison with the PEGylated

peptide. *J Pept Sci.* 2014;20(1):7-19.

60. Dalboge LS, Pedersen SL, van Witteloostuijn SB, Rasmussen JE, Rigbolt KT, Jensen KJ, et al. Synthesis and evaluation of novel lipidated neuromedin U analogs with increased stability and effects on food intake. *J Pept Sci.* 2015;21(2):85-94.

61. Takayama K, Mori K, Sohma Y, Taketa K, Taguchi A, Yakushiji F, et al. Discovery of potent hexapeptide agonists to human neuromedin u receptor 1 and identification of their serum metabolites. *ACS medicinal chemistry letters.* 2015;6(3):302-7.

62. Takayama K, Mori K, Tanaka A, Nomura E, Sohma Y, Mori M, et al. Discovery of a Human Neuromedin U Receptor 1-Selective Hexapeptide Agonist with Enhanced Serum Stability. *Journal of medicinal chemistry.* 2017;60(12):5228-34.

63. Marsh DJ, Pessi, Antonella , Bednarek, Maria A. , Bianchi, Elisabetta , Ingallinella, Paolo , Peier, Andrea M. , inventor; United States, assignee. NEUROMEDIN U RECEPTOR AGONISTS AND USES THEREOF patent US 2007/0244048 A1. 2007 Oct. 18, 2007.

64. Inooka H, Sakamoto K, Shinohara T, Masuda Y, Terada M, Kumano S, et al. A PEGylated analog of short-length Neuromedin U with potent anorectic and anti-obesity effects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2017;25(8):2307-12.

65. Kanematsu-Yamaki Y, Nishizawa N, Kaisho T, Nagai H, Mochida T, Asakawa T, et al. Potent Body Weight-Lowering Effect of a Neuromedin U Receptor 2-selective PEGylated Peptide. *Journal of medicinal chemistry.* 2017;60(14):6089-97.

66. Dalboge LS, Pedersen SL, Secher T, Holst B, Vrang N, Jelsing J. Neuromedin U inhibits food intake partly by inhibiting gastric emptying. *Peptides.* 2015;69:56-65.

67. Niimi M, Murao K, Taminato T. Central administration of neuromedin U

activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrine*. 2001;16(3):201-6.

68. Ivanov TR, Lawrence CB, Stanley PJ, Luckman SM. Evaluation of neuromedin U actions in energy homeostasis and pituitary function. *Endocrinology*. 2002;143(10):3813-21.

69. Ozaki Y, Onaka T, Nakazato M, Saito J, Kanemoto K, Matsumoto T, et al. Centrally administered neuromedin U activates neurosecretion and induction of c-fos messenger ribonucleic acid in the paraventricular and supraoptic nuclei of rat. *Endocrinology*. 2002;143(11):4320-9.

70. Simpson KA, Martin NM, Bloom SR. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2009;53(2):120-8.

71. Ronnekleiv OK, Fang Y, Zhang C, Nestor CC, Mao P, Kelly MJ. Research resource: Gene profiling of G protein-coupled receptors in the arcuate nucleus of the female. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2014;28(8):1362-80.

72. Van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, et al. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest*. 1997;99(3):385-90.

73. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2000;105(12):1827-32.

74. Thompson EL, Murphy KG, Todd JF, Martin NM, Small CJ, Ghatei MA, et al. Chronic administration of NMU into the paraventricular nucleus stimulates the HPA axis but does not influence food intake or body weight. *Biochemical and biophysical research*

communications. 2004;323(1):65-71.

75. Brown DR, Quito FL. Neuromedin U octapeptide alters ion transport in porcine jejunum. *European journal of pharmacology*. 1988;155(1-2):159-62.

76. Dass NB, Bassil AK, North-Laidler VJ, Morrow R, Aziz E, Tuladhar BR, et al. Neuromedin U can exert colon-specific, enteric nerve-mediated prokinetic activity, via a pathway involving NMU1 receptor activation. *Br J Pharmacol*. 2007;150(4):502-8.

77. Mayer EA, Bradesi S, Chang L, Spiegel BM, Bueller JA, Naliboff BD. Functional GI disorders: from animal models to drug development. *Gut*. 2008;57(3):384-404.

78. Monnikes H, Tebbe JJ, Hildebrandt M, Arck P, Osmanoglou E, Rose M, et al. Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*. 2001;19(3):201-11.

79. Stengel A, Tache Y. Neuroendocrine control of the gut during stress: corticotropin-releasing factor signaling pathways in the spotlight. *Annual review of physiology*. 2009;71:219-39.

80. Frayn KN. Visceral fat and insulin resistance--causative or correlative? *The British journal of nutrition*. 2000;83 Suppl 1:S71-7.

81. Halatchev IG, Cone RD. Peripheral administration of PYY(3-36) produces conditioned taste aversion in mice. *Cell Metab*. 2005;1(3):159-68.

82. Chelikani PK, Haver AC, Reidelberger RD. Dose-dependent effects of peptide YY(3-36) on conditioned taste aversion in rats. *Peptides*. 2006;27(12):3193-201.

83. Liang NC, Bello NT, Moran TH. Additive feeding inhibitory and aversive effects of naltrexone and exendin-4 combinations. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(2):272-8.

84. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature neuroscience*. 1998;1(4):271-2.
85. Gartlon J, Szekeres P, Pullen M, Sarau HM, Aiyar N, Shabon U, et al. Localisation of NMU1R and NMU2R in human and rat central nervous system and effects of neuromedin-U following central administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004;177(1-2):1-14.
86. Stoicea N, Gan TJ, Joseph N, Uribe A, Pandya J, Dalal R, et al. Alternative Therapies for the Prevention of Postoperative Nausea and Vomiting. *Front Med (Lausanne)*. 2015;2:87.
87. Broadwell RD, Brightman MW. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *The Journal of comparative neurology*. 1976;166(3):257-83.
88. Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR. Obesity and appetite control. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:824305.
89. Secher A, Jelsing J, Baquero AF, Hecksher-Sorensen J, Cowley MA, Dalboge LS, et al. The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4473-88.
90. Miller AD, Leslie RA. The area postrema and vomiting. *Frontiers in neuroendocrinology*. 1994;15(4):301-20.
91. Zeltser LM. Feeding circuit development and early-life influences on future feeding behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018;19:302.
92. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*. 2010;160(7):1577-9.

93. Toye AA, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, et al. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*. 2005;48(4):675-86.
94. Tschop M, Heiman ML. Rodent obesity models: an overview. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2001;109(6):307-19.
95. Masuda Y, Kumano S, Noguchi J, Sakamoto K, Inooka H, Ohtaki T. PEGylated neuromedin U-8 shows long-lasting anorectic activity and anti-obesity effect in mice by peripheral administration. *Peptides*. 2017;94:99-105.
96. Curtis MJ, Alexander S, Cirino G, Docherty JR, George CH, Giembycz MA, et al. Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *Br J Pharmacol*. 2018;175(7):987-93.
97. Moritoh Y, Takeuchi K, Hazama M. Combination treatment with alogliptin and voglibose increases active GLP-1 circulation, prevents the development of diabetes and preserves pancreatic beta-cells in prediabetic db/db mice. *Diabetes Obes Metab*. 2010;12(3):224-33.