

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4852245号
(P4852245)

(45) 発行日 平成24年1月11日(2012.1.11)

(24) 登録日 平成23年10月28日(2011.10.28)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 31/435 (2006.01) A 6 1 K 31/435
A 6 1 P 25/00 (2006.01) A 6 1 P 25/00 I O I
A 6 1 P 25/20 (2006.01) A 6 1 P 25/20
C O 7 D 211/26 (2006.01) C O 7 D 211/26

請求項の数 1 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2004-549279 (P2004-549279)	(73) 特許権者	501008819
(86) (22) 出願日	平成15年10月31日(2003.10.31)		センター ナショナル デ ラ レシエル
(65) 公表番号	特表2006-520319 (P2006-520319A)		シェ サイエнтиフィック (シーエヌアールエス)
(43) 公表日	平成18年9月7日(2006.9.7)		CENTRE NATIONAL DE
(86) 国際出願番号	PCT/FR2003/003262		LA RECHERCHE SCIENT
(87) 国際公開番号	W02004/042063		IFIQUE (CNRS)
(87) 国際公開日	平成16年5月21日(2004.5.21)		フランス国 パリ セダー 16 エフー
審査請求日	平成18年9月21日(2006.9.21)		75794 ルー ミッシュェル アンジュ
(31) 優先権主張番号	02/13725		3
(32) 優先日	平成14年10月31日(2002.10.31)		3 rue Michel Ange F
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		-75794 Paris Cedex
前置審査			16 France
		(74) 代理人	100092897
			弁理士 大西 正悟
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 強迫行動に関連した疾患又は肥満を治療及び／又は予防するための薬剤を調製するための医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

拒食症又は乱用薬物嗜癖を治療又は予防するための薬剤調製用の 5 - H T ₄ 受容体のリガンド又は該リガンドの医薬的に許容可能な塩の使用であって、

前記リガンドは 5 - H T ₄ 受容体拮抗薬である、R S 3 9 6 0 4 (1 - [4 - アミノ - 5 - クロロ - 2 - (3 , 5 - ジメトキシフェニル) メチルオキシ] - 3 - [1 [2 - メチルスルホニルアミノ] エチル] ピペリジン - 4 - イル] プロパン - 1 - オン) であることを特徴とする上記使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ストレスに関連する、又は関連しない拒食症、過食症、及び乱用薬物嗜癖のような強迫行動に関連する疾病の治療及び予防の分野、並びに肥満の治療及び予防の分野に関する。本発明は、特に、強迫行動に関連した前記疾病及び肥満を治療及び／又は予防するための薬剤を調製するための 5 - H T ₄ 受容体のリガンドの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

食事性障害は、不安及びうつ病と共存し、かつ先進国で懸念事項として増加している (Garrow, 1991 ; Kuczmarski et al., 1994)。大部分の神経精神医学疾患のように、環境因子及び遺伝的素因の影響の組み合わせが、これらの行

動欠陥の原因であるように見える (Fairburn et al., 1998; Lilienfeld et al., 1998; Barsh et al., 2000)。75%の拒食症女性の母親は、その子供の症状発現の1年前に、うつ病を患っているか、又はアルコール中毒である。拒食症候群に関連したいかなる遺伝子も同定されていないが、拒食症候群はまた、一般集団よりも同一の家族において頻繁に検出される。過食症行動は、同一の個人においてしばしば拒食症と同時に起きるが、多量食物摂取の衝動的かつ反復的段階を特徴とする。

【0003】

過食症も、嗜癖に関連する行動の中に分類される (国際精神医学定義、DSM)。食物は、獲得が、意思に基づき (「wanting」: 食欲/誘因動機)、かつ快楽主義に関連した構成要素によって動機付けられる (「liking」: 快楽/嗜好性) 報酬であるようにみなされ得る (Hoebel, 1997; Salamone et al., 1997; Stratford and Kelly, 1997; Stratford and Kelly, 1999)。食物摂取の過剰又は欠如は、代謝及び/又は内分泌欠陥に限定されず、ストレス (Donohoe, 1984; Morley et al., 1983; Vergoni and Bertolini, 2000)、不安 (Godart et al., 2000)、及びうつ病 (Viesselman and Roig, 1985; Casper, 1998) にも依存する。

【0004】

視床下部、扁桃及び海馬は、食物消費の調節に関与する。更に、側坐核のニューロンの活性は、予想の際に、又は食物若しくは乱用薬物のような古典的報酬の獲得後に修飾される (Di Chiara, 1995; Hoebel, 1997; Koob and Nestler, 1997; Salamone et al., 1997)。

【0005】

発見が出現したことにより、食物行動の調節における多数のペプチドの関与が証明されている (レプチン、オレキシン/ヒポクレチン、CART、NPY、POMC、CRH、TRH) が、セロトニン (5-HT) 及びドーパミン (DA) のような古典的な神経伝達物質の影響は、依然として無視できない。GABA及びグルタミン酸もまた考察すべきである (Taber and Fibiger, 1997; Kelley and Swanson, 1997; Stratford and Kelley, 1997; Stratford et al., 1998)。

【0006】

側坐核のドーパミン作動性系は、報酬 (乱用薬物、食物) の予測に関与する。DA受容体の拮抗薬である、クロザピンの慢性投与は、食欲亢進を引き起こす (Ackerman and Nolan, 1998; Allison et al., 1999)。DA伝達を増大させることで知られているコカイン及びアンフェタミンは、食欲不振誘発性である (Foltin and Evans, 1999)。

【0007】

しかしながら、肥満患者においてセロトニンを捕獲する阻害剤である (Guy-Grand B, 1995)、フェンフルラミンの使用のために、セロトニン作動性系は、食物摂取を制御する不可避なリンクにとどまっている (Barnes and Sharp, 1999)。

【0008】

要するに、環境因子 (ストレス) 及び遺伝的因子 (脳内に存在する受容体をコードする遺伝子) 間の相互作用の組み合わせの欠陥が、過食症、拒食症又は乱用薬物嗜癖のような行動障害の原因であるように思える。これらの疾患、及びより明白には過食症は、今日、毒物嗜癖行動と考えられている。

【0009】

神経生物学の次元で、我々の知識の現状により、食物行動を調節するために幾つかのニューロン系の組み合わせされた介在が容易にされる。最も知られているものは、5-HTが

10

20

30

40

50

そうであるところの脳メッセンジャー（神経伝達物質）を発現するセロトニン作動性系である。それらの作用が現れる脳の領域は、主に視床下部、扁桃及び側坐核である。

【0010】

ストレスの効果及び5-HT間の正確な関係は、セロトニン作動性系及び視床下部-下垂体軸の活性の間の相互影響によって複雑にされる（Chaoulouff F.、2000）。それに反して、ストレスを加えることは、セロトニン作動性伝達の増加を引き起こす。

【0011】

ストレスは、セロトニン作動性伝達の上昇をもたらす。ストレスが条件恐怖と結びついた実験パラダイムは、正中前前頭皮質（Adell et al.、1997；Inoue et al.、1994）、側坐核（Inoue et al.、1994；Ge et al.、1997）、扁桃（Amat et al.、1998）及び背面海馬（Ge et al.、1997；Joseph and Kennett、1983）における5-HTの代謝及び放出の増大をもたらす。特に、拘束ストレス（強制固定化）は、ラット及びマウスの視床下部および扁桃における5-HT再生を増大させる（Kons tandi et al.、2000）。同様に、皮質中脳辺縁系のセロトニン作動性ニューロンに対する「コルチコトロピン放出ホルモン又は因子」（CRF）の作用は、5-HTの率を変更し得る（Lowry et al.、2000；Price and Lucki、2001）。その上、グルココルチコイド受容体の働きの変化は、側坐核における5-HT濃度の変動を引き起こす（Sillaber et al.、1998）。更に、コルチコステロンの反復注射は、5-HT₄受容体作動薬によって誘発される海馬（CA1）のニューロンの活性化を増大させる（Zahorodna et al.、2000）。最後に多数の研究は、CRFがストレスの拒食症誘発性効果の原因であることを推測している。特に、CRFの脳室内注射は、マウスにおいて食物摂取の減少を誘発する（Momose et al.、1999）。

【0012】

セロトニンは、食物摂取を阻害する。形質転換生成戦略に組み合わせた薬理学的アプローチは、5-HT_{1A/1B}及び5-HT_{2A/2C}受容体が、食物摂取、及び更にストレスの調節に関与することを示している（Bonasera et Tecott、2000；Bouwknicht et al.、2001；Dourish et al.、1986；Heisler et al.、1998；Lucas et al.、1998；Samanin et Garattini、1996）。その場合、ストレスに関連した拒食症は、セロトニン作動性ニューロンの活性増大の結果生じると推測される。多数の研究は、フェンフルラミンの拒食症誘発性効果を、5-HT_{1B}受容体の活性化によるものとしているが、他方で、5-HT放出を阻害する、5-HT_{1A}受容体（オートレセプター）の活性化は、食物摂取の上昇を誘発する。フェンフルラミン注射に対する5-HT_{1B}受容体を有さないマウスの無感受性は、食物摂取調節におけるその関与を確認している（Lucas et al.、1998）。5-HT_{2C}受容体を失ったマウスは、肥満であることが判明しているため、5-HT_{2C}受容体も食物消費に介在する（Heisler et al.、1998）。レプチンは、食物摂取を減少させるとして知られているが、この肥満には関連しない（Nonogaki et al.、1998）。

【0013】

最近の研究は、5-HT_{2C}受容体もフェンフルラミンの拒食症誘発性効果の原因であることを証明している（Vickers et al.、2001）。最後に、5-HT₃及び5-HT₄受容体の拮抗薬であるトロピセトロン投与は、単一のアミノ酸によって変更される食餌療法の食物摂取を増大させる（Erecius et al.、1996）が、この効果は、5-HT₃受容体によるものとされた（Jiang and Gietzen、1994）。従って、食物摂取における5-HT₄受容体の寄与に関して、今日ではいかなるデータも利用できない。

10

20

30

40

50

【0014】

要するに、ストレスが食物摂取を減少させることを説明するための現在の仮説は、2つ群の並行する研究に立脚している。第1のものは、ストレスが、視床下部-下垂体軸（ストレス軸）及びセロトニン作動性ニューロンの活性を増大させることを記載している。その上、視床下部-下垂体軸の活動過剰は、CRF、ウロコルチン、及び最終ステップでコルチコステロンのようなホルモンの率の増大をもたらす。第2の群の分析は、ストレス軸のホルモン及び5-HTが、食物摂取を阻害することを示している。

【0015】

従って、多数の著者は、次の事象シーケンスを提案している：

ストレスを加える→ 脳 →拒食症
 ↗ー視床下部ー下垂体
 又は／及び？
 ↗ーセロトニン作動性ニューロン

10

【0016】

5-HT受容体全体は、イオンチャネルである5-HT₃受容体を除き、Gタンパク質に結合される(Saudou and Hen, 1994)。5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1D}、5-HT_{1E}、及び5-HT_{1F}受容体は、アデニル酸シクラーゼに陰性結合し、5-HTに関して強い親和力を有する。5-HT₂受容体の活性化は、ホスホリパーゼC(5-HT_{2A/2C})の活性を刺激する。5-HTの他の受容体は、アデニル酸シクラーゼに陽性結合し、かつショウジョウバエにおいて5-HT₄、5-HT_d、_r、_o、₁を、かつ哺乳動物において5-HT₆及び5-HT₇受容体を含む。5-HT₄受容体が、初めて小丘において記載され(Dumuis et al., 1988)、かつその刺激は、海馬、大脳皮質、心房及び食道においてcAMP率の上昇を引き起こす。ヒトにおいて、5-HT_{4A}、5-HT_{4B}、5-HT_{4C}、5-HT_{4D}、5-HT_{4E}、5-HT_{4F}、5-HT_{4G}、5-HT_{4BH}、及び5-HT_{4N}と名付けられた、5-HT₄受容体の9種のサブタイプは、その端部、C末端により異なっている(Bockaert et al., 2003、雑誌に印刷中)。5-HT_{5A}受容体の伝達系は、アデニル酸シクラーゼに陽性結合する。5-HT_{5B}のそれは、まだ同定されていない。

20

【0017】

5-HT₄受容体の機能的影響は、胃腸管において非常に研究されたが、その脳における寄与に関しては、僅かなデータしか利用できない。齧歯目及びヒトの脳の構造全体から、最も高密度の5-HT₄受容体が、辺縁系において検出されている(Waeber et al., 1994)。特に、その濃度は、側坐核の「コア」よりも「シェル」において3倍高い(Compan et al., 1996)。齧歯目の脳において、その率は、発育中に変化し、生後21日目でなければ成体レベルに達しない(Waeber et al., 1994)。ラットの脳で、5-HT₄受容体をコードするmRNAの率は、嗅覚系、線条体、側坐核、手綱及び海馬において最も高い(Gerald et al., 1995; Ulmer et al., 1996; Vilaro et al., 1996)。

30

40

【0018】

5-HT₄受容体の作動薬は、記憶化欠陥の減少をもたらす、かつアセチルコリン伝達の使用による学習を改良する(Bockaert et al., 1998)。5-HT₄受容体が、食物学習に関連した側坐核のニューロン機構に参加し得ると推測することは、魅力的である。4件の薬理学的研究が、ラット及びマウスの「不安」状態における5-HT₄受容体の低い寄与を考慮した(Cheng et al., 1994; Silvestre et al., 1996; Kennett et al., 1997; Costall and Naylor, 1997)。5-HT₄受容体の阻害は、基礎条件でラット(Fontana et al., 1997)、生後20~27日の若いマウス(Semenova and Ticku, 1992)において歩行活動の低下を引き

50

起し、かつコカインによって誘発される過剰歩行運動を緩和し得る (Mc Mahon and Cunningham、1999)。

【0019】

線条体において、5-HT₄受容体の活性化による細胞外DA率のセロトニン作動性制御は、同時にエクサイター又はインヒビターとして記載されている (Bonhomme et al.、1995; Steward et al.、1996; Deurwaerdere et al.、1997)。

【0020】

最後に、5-HT₄受容体の刺激は、カリウムイオンチャネルの閉鎖を誘発し (Bockaert et al.、1998)、それは、ニューロンの興奮性を維持し、かつ神経伝達物質の放出を増大させ得る。このデータを踏まえると、5-HT₄受容体の刺激は、海馬において細胞外5-HT率上昇に至らせる。

10

【0021】

要するに、神経生物学的次元で、5-HT₄受容体は、学習及び記憶に介在するとして知られている。それらが運動行動及び不安状態に寄与し得ることは、今日、中程度として記載され、ほとんど研究されていないことが判明している。唯一の研究は、この受容体が歩行活動に対するコカインの効果に介在し得ることを示している。

【0022】

更に、WO97/29739号で公開された国際特許出願は、セロトニン再同化の選択的インヒビターによって引き起こされる胃腸効果を回避、緩和、除去又は抑制するための薬剤調製のための5-HT₄受容体の拮抗薬の使用を記載している。WO02/11766号で公開された国際特許出願は、ある種の心臓血管条件の予防又は治療における5-HT₄受容体の拮抗薬の使用を記載している。

20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0023】

驚くべきことに、発明者は、胎児期からのセロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子の欠如によって、成体マウスが、野生動物よりも拒食症誘発性ストレスに対する感受性を低くなることを証明した。換言すれば、ある種のストレスは、野生マウスにおいて食物摂取を減少させるが、5-HT₄受容体を有さないマウスにおいては効果が弱い。従ってこの受容体が欠如するなら、マウスは、遺伝的に修飾されていない同属種よりも多くの食物を消費する。

30

【0024】

ストレスは、拒食症の出現に寄与し、過食症を伴い、かつ乱用薬物への感受性を増大させるので、発明者は、5-HT₄受容体のリガンドが、これらの疾患の発現を緩和し得ることを提案した (ストレスに関連した、又は関連しない拒食症、過食症、乱用薬物嗜癖)。

【0025】

本発明において、「5-HT₄受容体」とは、5-HT_{4A}、5-HT_{4B}、5-HT_{4C}、5-HT_{4D}、5-HT_{4E}、5-HT_{4F}、5-HT_{4G}、5-HT_{4BH}、及び5-HT_{4N}受容体のような、5-HT₄受容体のサブタイプ (又はスプライシングバリエーション) のいずれかを意味する。

40

【0026】

従って、本発明は、強迫行動に関連する疾患又は肥満を治療及び/又は予防するための薬剤調製用の、5-HT₄受容体のリガンド又はこのリガンドの医薬的に許容可能な塩の使用に関する。

【0027】

「強迫行動に関連する疾患」とは、食物障害を関与させる疾患、及び特にはストレスに関連した、又は関連しない拒食症、過食症、乱用薬物嗜癖を意味する。

【0028】

50

強迫行動に関連する疾患及び／又は肥満を治療及び／又は予防するための薬剤を調製するために、本発明の枠内で使用される 5 - H T₄ 受容体のリガンドは、好ましくは 5 - H T₃ 受容体のリガンドでなく、5 - H T₄ 受容体に特異的なリガンドである。

【 0 0 2 9 】

発明者は、5 - H T₄ 受容体が、ストレスの拒食症誘発性効果に関与することを明らかにしたので、この受容体の作動薬使用により、過食症を治療及び／又は予防するための薬剤を調製することが可能になり、他方でこの受容体の拮抗薬又は逆作動薬が、拒食症及び乱用薬物嗜癖からなる群から選択される強迫行動に関連する疾患を治療及び／又は予防するための薬剤を調製することに役立つことは、当業者にとって容易に理解できる。

【 0 0 3 0 】

本発明の枠内において：

- 作動薬とは：内因性伝達物質に類似した生物学的応答を、その受容体への結合によって発生させることが可能なあらゆる分子を意味する。

- 拮抗薬とは：作動薬の作用を遮断することが可能なあらゆる分子を意味する。

- 逆作動薬とは：受容体の固有（又は基礎）活性を阻害することが可能なあらゆる分子を意味する。

【 0 0 3 1 】

公知の、又はまだ同定されない、5 - H T₄ 受容体に特異的な全ての作動薬、全ての逆作動薬及び全ての拮抗薬は、本発明の実施において使用される可能性がある。

【 0 0 3 2 】

B o c k a e r t e t a l . (1 9 9 7) は、5 - H T₄ 受容体作動薬及び拮抗薬の化学構造を記載した。記載された作動薬は、6つの化学分類に属し、インドール、ベンズアミド、安息香酸、アリール - ケトン、ベンズイミダゾロン及び 1 , 8 - ナフタルイミドがそれぞれである。記載された拮抗薬は、5つの化学分類に属し、インドールカルボキシレート、イミダゾールピリジン、安息香酸、アリール - ケトン、ベンズイミダゾロン及び 1 , 8 - ナフタルイミドがそれぞれである。これらの作動薬及び拮抗薬は、本発明の枠内で使用可能である。C l a e y s e n e t a l . , (2 0 0 1) 及び J o u b e r t e t a l . (2 0 0 2) に記載された逆作動薬も、同様に本発明の枠内で使用可能である。

【 0 0 3 3 】

更に、W O 9 7 / 2 9 7 3 9 号及び W O 0 2 / 1 1 7 6 6 号で公開された国際特許出願、及び W O 0 2 / 3 6 1 1 3 号で公開された国際特許出願は、同様に本発明の枠内で使用可能である、5 - H T₄ 受容体の拮抗薬及び作動薬をそれぞれ記載している。

【 0 0 3 4 】

本発明の枠内で使用可能である作動薬は、メトクロプラミド、H T F 9 1 9 (3 - (5 - メトキシ - 1 H - インドール - 3 - イルメチレン) - N - ベンチルカルバズイミドアミド水素マレイン酸塩)、L S 6 5 0 1 5 5、B R L 2 0 6 2 7、B R L 2 4 6 8 2、B R L 2 4 9 2 4、シサプリド (C a r l s s o n e t a l . , 1 9 9 7)、M L 1 0 3 5 (4 - アミノ - 5 - クロロ - 2 - [2 - (メチルスルフィニル) - エトキシ] - N - [2 - (ジメチルアミノ) エチル] - ベンズアミド塩酸塩)、モサプリド (C a r l s s o n e t a l . , 1 9 9 7)、R 0 7 6 1 8 6、レンザプリド、R S 6 7 5 0 6 (1 - (4 - アミノ - 5 - クロロ - 2 - メトキシフェニル) - 3 - [1 - (2 - メチルスルホニルアミノ) エチル - 4 - ピペリジニル] - 1 - プロパノン塩酸塩)、シニタブリド、S B 2 0 5 1 4 9、S C 4 9 5 1 8 (N - [エキソ - (ヘキサヒドロ - 1 H - ピロリジン - 1 - イル) メチル] - 2 - メトキシ - 4 - アミノ - 5 - クロロベンズアミド H C l)、S C 5 2 4 9 1、S C 5 3 1 1 6 (4 - アミノ - 5 - クロロ - N - [(ヘキサヒドロ - 1 H - ピロリジン - 1 - イル) メチル] 2 - メトキシベンズアミド)、S D Z 2 1 6 4 5 4、T K S 1 5 9 (4 - アミノ - 5 - クロロ - 2 - メトキシ - N - [(2 S , 4 S) - 1 - エチル - 2 - ヒドロキシメチル - 4 - ピロリジニル] ベンズアミド)、Y 3 4 9 5 9、Y M 0 9 1 5 1 (N - (1 - ベンジル - 2 - メチルピロリジン - 3 - イル) - 5 - クロロ - 2 - メトキシ - 4 - メチルアミノゼンズアミド、Y M 4

10

20

30

40

50

7813、ザコプリド(4-アミノ-5-クロロ-2-メトキシ-N-(1-アザビシクロ[2.2.2]オクト-3-イルベンズアミド)、ML 10302(2-ピペリジノエチル 4-アミノ-5-クロロ-2-メトキシ安息香酸塩)、RS 57639、SR 59768(2-[(3S) -3-ヒドロキシピペリジノ]エチル 4-アミノ-5-クロロ-2-メトキシ安息香酸塩)、ADR 932、ブルカロプリド(R093877; 4-アミノ-5-クロロ-2,3-ジヒドロ-N-[1-(3-メトキシプロピル)-4-ピペリジニル]-7-ベンゾフランカルボキサミド塩酸塩)、SK 951、RS 67333(1-(4-アミノ-5-クロロ-2-メトキシフェニル)-3-(1-n-butyl-4-ピペリジニル)-1-プロパノン)、RS 17017、RS 56532、YM 53389、BIMU1(3-エチル-2,3-ジヒドロ-N-[エンド-8-メチル-8-アザビシクロ(3.2.1)オクト-3-イル]-2-オキソ-1H-ベンズイミダゾール-1-カルボキサミド)、BIMU8(エンド-N-8-メチル-8-アザビシクロ[3.2.1]オクト-3-イル)-2,3-デヒドロ-2-オキソ-3-(プロブ-2-イル)-1H-ベンズイミド-アゾール-1-カルボキサミド)、DAU 6215((3-アルファ-トロパニル)1H-ベンズイミダゾロン-3-カルボキサミド塩化物)、DAU 6236、5-メトキシトリプタミン、2-メチルセロトニン及び5-ヒドロキシ-N,N-ジ-メチルトリプタミン及び5-カルボキサミドトリプタミンを含む群から選択される。

【0035】

本発明の枠内で使用可能な拮抗薬は、好適には、トロピセトロン(ICS 205930; [(3aトロパニル)-1H-インドール-3-カルボン酸エステル])、RS 100235(1-(8-アミノ-7-クロロ-1,4-ベンゾジオキサン-5-イル)-3-[[3,4-ジメトキシフェニル)プロブ-1-イル]ピペリジン-4-イル]プロパン-1-オン)、RS 39606、A-85380(3-(2(S)-アゼチジニルメトキシ)ピリジン)、GR 113808(1-[2-[(メチルスルホニル)アミノ]エチル]-4-ピペリジニル]メチル 1-メチル-1H-インドール-3-カルボン酸塩)、GR 125487(1-[2-[(メチルスルホニル)アミノ]エチル]-4-ピペリジニル]メチル 5-フルオロ-2-メトキシ-1H-インドール-3-カルボン酸塩)、GR 138897([1-[2-[(メチルスルホニル)アミノ]エチル]-4-ピペリジニル]メチル[(2-(3-メチル-1,2,4-オキサジアゾル-5-イル)フェニル]カルバミン酸塩、SB 203186(1-ピペリジニル)エチル 1H-インドール 3-カルボン酸塩)、SDZ 205557 2-メトキシ-4-アミノ-5-クロロ安息香酸 2-(ジエチルアミノ)エチルエステル、塩酸塩、LY 353433(1, (1-メチルエチル)-N-(2-(4-(トリシクロ[(2-(3.3.1.1^{3,7})]デカ-1-イルカルボニル)アミノ)-1-ピペリジニル)エチル)-1H-インダゾール-3-カルボキサミド)、LY 297582、RS 23597(3-(ピペリジン-1-イル)プロピル-4-アミノ-クロロ-2-メトキシ安息香酸塩酸塩、SB 204070(1-ブチル-4-ピペリジニル)メチル 8-アミノ-7-クロロ1,4-ベンゾジオキサン-5-カルボン酸塩)、DAU 6285{(エンド-6-メトキシ-8-メチル-8-アザビシクロ[3.2.1]オクト-3-イル)-2,3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-ベンズイミダゾール-1-カルボン酸塩酸塩}、SC 53606(1-S, 8-S)-N-[(ヘキサヒドロ-1H-ピロリジン-1-イル)メチル]-6-クロロイミダゾ[1,2-a]ピリジン-8-カルボキサミド塩酸塩)、SC 56184、RS 67532(1-(4-アミノ-5-クロロ-2-(3,5-ジメトキシベンジロキシフェニル)-5-(1-ピペリジニル)-1-ペンタノン)、GR 125487(1-[2(メチルスルホニル)アミノ]エチル]-4-ピペリジニル]メチル-5-フルオロ-2-メトキシ-1H-インドール-3-カルボン酸塩酸塩)、SB 207058、SB 207266(N-[1-ⁿブチル-4-ピペリジニル)メチル]-3,4-ジヒドロ-2H-[1,3]オキサジノ[3,2-a]インドール-10-カルボキサミド)、RS 39604(1-[4-アミノ-5-クロロ-2-

10

20

30

40

50

(3 , 5 - ジメトキシフェニル) メチルオキシ] - 3 - [1 [2 - メチルスルホニルアミノ] エチル] ピペリジン - 4 - イル] プロパン - 1 - オン) 、 R S 1 0 0 3 0 0 2 (N - (2 - (4 - (3 - (8 - アミノ - 7 - クロロ - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 , 4 - ベンゾジオキシン - 5 - イル) - 3 - オキソプロピル) ピペリジン - 1 - イル) エチル) - メタンスルホンアミド) 、 M L 1 0 3 7 5 (2 - (c i s - 3 , 5 - ジメチルピペリジノ) エチル 4 - アミノ - 5 - クロロ - 2 - メトキシ安息香酸塩) 、 S B 2 0 7 7 1 0 (1 - ブチル - 4 - ピペリジニル) メチル - 8 - アミノ - 7 - ヨード - 1 , 4 - ベンゾジオキサ - 5 - カルボン酸塩) 、 S B 2 0 5 8 0 0 (N - (1 - ブチル - 4 - ピペリジル) メチル - 8 - アミノ - 7 - クロロ - 1 , 4 - ベンゾジオキサ - 5 - カルボキサミド) 、 N 3 3 8 9 、 F K 1 0 5 2 及び R 5 0 5 9 5 を含む群から選択される。

10

【 0 0 3 6 】

本発明の枠内で使用可能な逆作動薬は、R O 1 1 6 - 2 6 1 7 、 R O 1 1 6 - 0 0 8 6 及び R O 1 1 6 - 1 1 4 8 を含む群から選択される。

【 0 0 3 7 】

強迫行動に関連する疾患及び / 又は肥満の治療及び / 又は予防において有効な、5 - H T ₄ 受容体のリガンド又はこのリガンドの医薬的に許容可能な塩の量は、この障害の性質によって決まり、かつ標準的な実験及び臨床技術によって決定され得る。更に、インビトロテストは、最適分量範囲を同定するために、任意に使用され得る。有効量は、インビトロテストシステム又は動物モデルに対して得られる用量反応曲線から推定され得る。

20

【 0 0 3 8 】

5 - H T ₄ 受容体のリガンドを含む、強迫行動に関連する疾患及び / 又は肥満を治療及び / 又は予防するための医薬組成物は、標準的な医薬実務を踏まえて調製される。これらの医薬組成物は、経口、経口、直腸、経鼻、経皮、肺、中枢又は全身投与に適した形状を呈する。

【 0 0 3 9 】

これらの医薬組成物は、5 - H T ₄ 受容体のリガンド又はこのリガンドの医薬的に許容可能な塩に加えて、投与方法及び投与形状に応じて選択される、少なくとも1種の医薬的に許容可能なビヒクルを含む。

【 0 0 4 0 】

第2の実施形において、本発明は、強迫行動に関連する疾患及び / 又は肥満、および特には、疾患が5 - H T ₄ 受容体をコードする遺伝子における1つ又は幾つかの突然変異によって引き起こされるという場合での強迫行動に関連する疾患を治療又は予防するための「野生」5 - H T ₄ 受容体の、脳の標的領域における復元に関する。

30

【 0 0 4 1 】

従って、本発明は、強迫行動に関連する疾患を治療及び / 又は予防するための薬剤を調製するための、機能的5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体をコードする核酸の使用に関する。

【 0 0 4 2 】

「機能的5 - H T ₄ 受容体」とは、正常な薬理学特性を有する野生5 - H T ₄ 受容体を意味する。

40

【 0 0 4 3 】

「機能的に同等な受容体」とは、アミノ酸配列が、5 - H T ₄ 受容体のそれと近く（少なくとも90%同一、かつ好ましくは少なくとも95%同一）、かつ野生5 - H T ₄ 受容体と同じ作動薬により、かつ同じ強度で活性化される受容体を意味する。

【 0 0 4 4 】

機能的5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体をコードする核酸分子は、好適には、哺乳動物の5 - H T ₄ 受容体をコードする分子であり、及び特にはヒト5 - H T ₄ 受容体をコードする分子である。これらの配列は、Genbankで次の番号で得ることができる：

- ヒトに関して：Y 0 9 5 8 6 (5 - H T _{4 A}) 、 Y 1 0 4 3 7 (5 - H T _{4 B}) 、 Y

50

1 2 5 0 6 (5 - H T ₄ C)、Y 1 5 5 0 7 (5 - H T ₄ D)、A J 0 1 1 3 7 1 (5 - H T ₄ G)；

- マウスに関して：Y 0 9 5 8 7 (5 - H T ₄ A)、Y 0 9 5 8 5 (5 - H T ₄ B)、Y 0 9 5 8 8 (5 - H T ₄ E)、A J 0 1 1 3 7 0 (5 - H T ₄ F)；

- ラットに関して：U 2 0 9 0 6 (5 - H T ₄ A)、0 2 0 9 0 7 (5 - H T ₄ B)、及び A J 0 1 1 3 7 1 (5 - H T ₄ E)；

- テンジクネズミに関して：Y 1 3 5 8 5 (5 - H T ₄ B)。

【 0 0 4 5 】

遺伝コード変質のために、実質的に同じアミノ酸をコードする核酸の他の配列が、本発明の枠内において使用され得る。これらの配列は、例として、かつ網羅的でなく、沈黙突然変異を生じさせるように、1つ又は幾つかのコドンのレベルで修飾された5 - H T ₄ 受容体をコードする核酸の全部又は一部を含むヌクレオチド配列である。本発明の枠内で使用可能な核酸配列は、先行技術において公知である様々な方法によって、例えば逆転写後に5 - H T ₄ 受容体のmRNAから得られるcDNAを経由して得ることができる。

【 0 0 4 6 】

好適には、側坐核、扁桃、海馬及び視床下部は、5 - H T ₄ 受容体をコードする遺伝子の発現を同時に修復すること、及びその欠如に関連する食物摂取の調節に対する欠陥を除去することが検討される脳構造である。この遺伝子の発現回復の結果、分子及び細胞（例えば、内因性モノアミン率、セロトニン作動性ニューロン活性）、及び行動欠陥の同時修復のみにより、分子及び行動表現型の間の因果関係の妥当性を確かめることが可能になる。

【 0 0 4 7 】

好適には、側坐核、扁桃、海馬及び視床下部における機能的5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体を発現させるために、機能的5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体をコードする核酸分子を含む非ウイルス又はウイルスベクターのような、転移ベクターの使用を検討することができる。

【 0 0 4 8 】

本発明の枠内で使用可能なウイルスベクターの中で、2型アデノウイルスに関連したウイルス、様々な偽型を有するレンチウイルスから生じたベクター、ネコの免疫不全ウイルスから生じたベクター、及び「泡沫状ウイルス」から生じたベクター等を挙げることができる。本発明の枠内で使用されるウイルスベクターは、あらゆる病原及び/又は有害効果を免れている。

【 0 0 4 9 】

前記ベクター内に含まれる機能的5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体をコードする核酸分子の発現は、好適には、標的組織に応じて、適切なプロモーターの制御下に置かれる。側坐核、扁桃、海馬及び/又は視床下部における機能的5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体の発現に関して、好適には使用されるプロモーターは、側坐核に関してドーパミンを捕獲する輸送体をコードする遺伝子のプロモーターであっても良い。

【 0 0 5 0 】

第3の実施形において、本発明は、強迫行動に関連する疾患及び/又は肥満の治療及び/又は予防で使用される可能性がある生物活性を有する化合物、及び特には強迫行動に関連する疾患の治療及び/又は予防に関して生物活性を有する化合物を同定する方法であって、次のステップ：

a) 生物活性を有する前記化合物と、5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体を接触させること、及び

b) 生物活性を有する前記化合物が、5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体の基礎活性を変調することが可能であるか決定すること、を含むことを特徴とする方法に関する。

【 0 0 5 1 】

「生物活性を有する化合物」とは、投与後に、強迫行動に関連する疾患の症状を緩和す

10

20

30

40

50

ることが可能な、あらゆる天然又は合成化合物を意味する。

【0052】

本発明の対象である方法のステップ (a) は、最初に次のステップ：

i) 機能的 5 - H T₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体を発現する細胞を培養すること、及び

ii) 生物活性を有する前記化合物による前記細胞のインキュベーション、を含み得る。

【0053】

用語「機能的 5 - H T₄ 受容体」及び「機能的に同等な受容体」は、先に定義された通りである。

【0054】

好適には、本発明の対象である方法のステップ (i) で培養された細胞は、機能的 5 - H T₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体を表面に過剰発現させる細胞である。機能的 5 - H T₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体を表面に過剰発現させることが可能なあらゆる細胞は、本発明の枠内で使用可能である。例として、かつ網羅的でなくヒト胚細胞 H E K 293 が挙げられ得る。

【0055】

機能的 5 - H T₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体をコードする核酸分子又はベクターは、機能的 5 - H T₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体を過剰発現させる細胞を形質転換するために使用され得る。

【0056】

機能的 5 - H T₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体を過剰発現させる細胞を形質転換するために、本発明の枠内で使用され得るベクターは、以上に記載したような、好適には細胞宿主中の前記受容体の発現又は生成方法に適した制御配列に関連した、機能的 5 - H T₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体をコードする、少なくとも 1 種の核酸分子を含む。使用されるベクターは、それが転移されるべきである宿主 (培養細胞) に応じて選択される；プラスミドのような、あらゆるベクターのことであり得る。細胞宿主中の受容体の生成又は発現と全く同じように、これらベクターの調製は、当業者に周知である分子生物学及び遺伝子工学のあらゆる技術によって実行され得る。

【0057】

受容体の基礎活性を変調することが可能な化合物は、前記受容体の作動薬か、逆作動薬か、拮抗薬である。受容体への作動薬、逆作動薬、又は拮抗薬の結合は、この受容体の立体配座の変更を引き起こし、かつ細胞中で第 2 メッセンジャーを介した信号の形質導入が観察される。従って、本発明の対象である方法のステップ (b) の目的は、受容体及び生物活性を有する化合物の間の親和力を、それらを接触させた後に、あらゆる適切な方法によって測定することからなる。

【0058】

好適には、5 - H T₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体の基礎活性の変換は、5 - H T₄ 受容体からの信号の形質導入の (作動薬に関して) 活性化、又は (拮抗薬、又は逆作動薬に関して) 阻害を経由して測定され得る。この受容体からの信号の形質導入の際に誘発される事象カスケードを知る当業者は、例えば、機能的に活性である化合物と接触させる前及び後で c A M P 量を測定して、5 - H T₄ 受容体からの信号の形質導入の活性化、又は阻害を測定するために適した方法及び条件を決定することが可能であろう。

【0059】

本発明の対象の方法の第 2 の実施形において、ステップ (a) 及び (b) は、1 つ又は幾つかの 5 - H T₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体を 1 つ又は幾つかの膜に固定して行われ得る。5 - H T₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体は、同様にバイオセンサー中に加えられ得る。かかるシステムにおいて、テストする化合物及び受容体の間の相互作用をリアルタイムで視覚化することが可能である。受容体 / リガンド対のパートナーの 1 つは、脂肪鎖によって覆われたマトリックスを含み得る界面に固定される。この疎水性マトリックスは、接触して注射されるリボソームの自発溶解により、脂質層で容易に被覆され

10

20

30

40

50

得る。その場合、リボソーム中に挿入される 5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体は、バイオセンサー中に加えられ得る。その場合、生物活性を有する化合物は、1 つ又は幾つかの 5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体に対して分析される。バイオセンサーの技術により、結合の親和力を測定することが更に可能になる。

【 0 0 6 0 】

本発明は、先に定義したような、5 - H T ₄ 受容体の有効量のリガンド、又は先に定義したような、機能的 5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体をコードする核酸を投与することからなる、強迫行動に関連する疾患を治療及び / 又は予防する方法にも同様に關する。

【 0 0 6 1 】

出願人が得た結果により、5 - H T ₄ 受容体が、レプチン率を制御し、かつ従って肥満の制御に介在し得ることを明らかにすることが可能になった。実際、この作業により、5 - H T ₄ 受容体の欠如が、レプチン率の減少を誘発することが証明された。肥満は、月齢 6 ヶ月を超え、かつ従って以下の実験の部で使用されるマウスよりも年長である 5 - H T ₄ 受容体を失った突然変異マウスにおいて観察されたので、肥満におけるこの関与は、可能である。

【 0 0 6 2 】

従って、本発明は、肥満の治療及び / 又は予防のための医薬組成物を調製するための、先に定義したような 5 - H T ₄ 受容体のリガンド、及び特には、先に定義したような 5 - H T ₄ 受容体の作動薬の使用に關する。強迫行動の治療及び / 又は予防のための医薬組成物に關して検討した全ての実施形は、肥満の治療及び / 又は予防に適用される。

【 0 0 6 3 】

本発明の特殊な実施形において、本発明は、疾患が 5 - H T ₄ 受容体をコードする遺伝子における 1 つ又は幾つかの突然変異によって引き起こされるとする場合での肥満を治療又は予防するための「野生」5 - H T ₄ 受容体の、脳の標的領域における復元に関する。

【 0 0 6 4 】

従って、本発明は、肥満を治療及び / 又は予防するための薬剤を調製するための、機能的 5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体をコードする核酸の使用に關する。以上に検討された様々な実施形（哺乳動物の 5 - H T ₄ 受容体、ヒト 5 - H T ₄ 受容体、ウイルス又は非ウイルス転移ベクター等）は、肥満の治療及び / 又は予防にも同様に適用される。

【 0 0 6 5 】

このように、本発明は、先に定義したような、5 - H T ₄ 受容体の有効量のリガンド、及び特には作動薬、又は先に定義したような、機能的 5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体をコードする核酸を投与することからなる、肥満を治療及び / 又は予防する方法を提案する。

【 0 0 6 6 】

本発明は、肥満の治療及び / 又は予防で使用される可能性がある生物活性を有する化合物、及び特には肥満の治療及び / 又は予防に關して生物活性を有する化合物を同定する方法であって、次のステップ：

- a) 生物活性を有する前記化合物と、5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体を接触させること、及び
- b) 生物活性を有する前記化合物が、5 - H T ₄ 受容体、又は機能的に同等な受容体の基礎活性を変調することが可能であるか決定すること、を含むことを特徴とする方法に関する。

【 0 0 6 7 】

強迫行動に関連する疾病の治療及び / 又は予防における生物活性を有する分子の同定の枠内で記載された実施は、肥満の治療及び / 又は予防における生物活性を有する分子の同定に必要な変更を加えて適用される。出願人によって得られた結果を考慮すれば、肥満の治療及び / 又は予防における活性分子が、5 - H T ₄ 受容体の作動薬として機能すべきであ

10

20

30

40

50

ろうことは当業者にとって明白である。

【0068】

本発明のその他の利点及び特徴は、セロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウス及び野生マウスの比較研究に関し、かつ添付図面を参照する以下に続く実施例から現れるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0069】

I. 材料及び方法。

I. 1. セロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスの生成。

a. 原則。

形質転換生成が、一般原理であり、かつ生体における対象となる遺伝子の発現修飾からなる。マウスにおいて、修飾は、3つの連続するステップを必要とする(図1)。第1のステップは、多数の分子生物学技術の使用を必要とする。それは、対象となる遺伝子の欠失又は挿入の結果生じるゲノム構造の獲得、又はある種の窒化塩基の定方向突然変異誘発による修飾からなる。第2のステップは、全能マウス胚細胞(「胚幹細胞」又はES)におけるゲノム構造のトランスフェクションによる胚細胞のトランスフェクションを必要とする。突然変異遺伝子のそのゲノムへの挿入は、無作為の相同組み換えによって、かつ安定して行われる。その場合、抵抗性遺伝子は、ゲノム構造作成の際に予め挿入されるので、組み換えクローンは、抗生物質(G418又はネオマイシン)の使用によって選択される。最後のステップは、芽細胞中への陽性クローン注射である(図2)。

【0070】

b. 突然変異マウスにおける5-HT₄受容体欠如の確認。

突然変異マウスにおいて5-HT₄受容体欠如を確認するために、以前に記載されたように(Compan et al., 1996)、野生、ヘテロ接合及び突然変異動物の脳切片からのX線撮影技術が使用された。5-HT₄受容体の結合部位は、選択性放射性リガンド、5-HT₄受容体の拮抗薬である、[³H]GR113808(Amersham)によってマーキングされた。

【0071】

すでにラットにおいて観察されたように(Waeber et al., 1994、Compan et al., 1996)、野生マウスにおいて、[³H]GR113808によってマーキングされた結合部位の不均質分布は、基底核、辺縁系又は海馬形成において観察された。突然変異マウスにおいては、いかなる特異的マーキングも検出されなかった。マーキングされた結合部位の密度は、野生マウスと比較して、ヘテロ接合マウスにおいて分析された脳構造全体で、減少した(表1)。

【0072】

10

20

30

【表 1】

野生及びヘテロ接合遺伝子型の成体マウスにおいて $[^3\text{H}] \text{GR113808}$ (0.1 nM) によってマーキングされた 5-HT_4 受容体の結合部位の密度。

領域	f m o l / タンパク質 1 m g の B_{max} (平均±平均値の標準誤差)	
	野生	ヘテロ接合
嗅結節	201 ± 34	66 ± 16 (67%)
腹部淡蒼球	171 ± 37	53 ± 21 (70%)
側坐核	116 ± 28	36 ± 16 (68%)
吻線条体	115 ± 15	48 ± 11 (48%)
尾線条体	142 ± 25	18 ± 10 (85%)
淡蒼球	90 ± 20	14 ± 8 (85%)
海馬	104 ± 11	9 ± 8 (91%)

* タンパク質 1 m g / 脳組織 10 m g の濃度を考慮する

【0073】

予め同定されたマウスの遺伝子型も、連鎖反応重合技術(「タッチダウンプロトコール PCR」)の使用によって確認された。全てのテストする動物は、ヘテロ接合の番から生まれており、かつ月齢 4 ~ 6 ヶ月である。我々は、3 年の期間で 18 % の突然変異マウスを得た。我々は、メンデルの法則に従わないこの比の値に対する解釈を未だ有していない(表 2)。

【0074】

【表 2】

ヘテロ接合マウスの交配後に得られるメンデル比。

野生	ヘテロ接合	ホモ接合
36% (414)	46% (532)	18% (209)

【0075】

5-HT_4 受容体を失ったマウスは、その短期間の発育に対して野生マウスよりも体重増加が著しく高い点を除き、目立った障害もなく発育する(図 3)。月齢 4 ~ 6 ヶ月のマウスにおいて、体重のいかなる有意差も検出されなかった(図示せず)。ニューロン系の古典的な適応メカニズムは、発育中に現れ得るので、異例の状況が、成体期間中の食物消費障害を誘発し得るという仮説が、発明者によって表明された。

【0076】

I. 2. 行動テスト。

従って、野生動物と比較した突然変異マウスの食物消費及び体重増加が、拒食症誘発性ストレスを構成することとして知られる、拘束(強制固定化)テストの使用後に測定された。同様に、食物摂取が、葛藤テスト：一段高くした十字の迷路及び「オープンフィールド」、の使用後に算定された。これら 2 つの実験テストにおいて、齧歯目は、新規環境を探索する動機及び開放及び / 又は一段高くした空間の恐怖の間で葛藤に直面する。

【0077】

a. 動物。

野生及び突然変異動物は、Sv 129 / Ter 系統 (Phillips et al., 1999) から生じ、かつ 2 つの遺伝子型間の同じ遺伝的素因を保存するために、 5-HT_4 受容体をコードする遺伝子の突然変異のためにヘテロ接合 (+ / -) マウスの交配から生まれた。動物は、標準照明条件で、22 °C の制御され、かつ一定の温度及び湿度で、かつ 55 % の相対湿度で飼育され、かつ操作される。昼 / 夜サイクル (12 / 12 時

10

20

30

40

50

間)は、人工的に維持された。栄養物は、円筒形コイン型形状を有する(23%のタンパク質; 3.5%の粗脂肪; 3%の粗セルロース; 7.5%の粗灰分; 12%の含水量)。マウスの遺伝子型は、連鎖重合反応技術(「ポリメラーゼ連鎖反応」又はPCR)の使用によって同定される。全ての実験は、平均して月齢4~6ヶ月の動物によって行われた。

【0078】

b. 食物摂取の算定。

拘束テスト後。我々の各実験は、3つの段階に分割された: 順応期間(7日)、拘束ストレスの日(110分間の固定化)及び回復ステップ(10日)である。マウスは、基準及び拘束グループに分割された。ストレスの日、野生及び5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスは、NaCl 9%、5-HT₄受容体の拮抗薬である、1mg/kgのRS 39604の注射を受ける。並行して、マウスの1グループは、いかなる処置も受けず、かつ先のマウスのように、体重を計量され、かつ操作開始後10分に、必要な場合に固定化される。その場合食物消費は、回復期間中、2時間30分、3及び5時間並びに毎日測定される。

【0079】

3時間の隔離(手順1)後。動物は、無制限の栄養物及び水の存在下で檻に隔離される。栄養物の重量及び動物の体重は、隔離前及び3時間後に算定される。連続した2回の計量の間の差は、マウスによって摂取された栄養物の量を示す。檻の地面は、格子が張られているので、各動物によって浪費された栄養物の量を算定することが可能であった。

【0080】

一段高くした十字の迷路(手順2: 中程度ストレス)後。同じ動物が、収容室での1週間、檻によって4つに再編成される。実験の日、30分の期間後に、動物は、一段高くした十字の迷路に置かれ、次にテスト開始後3時間に栄養物の消費を算定するために隔離される。

【0081】

切開が先行する、一段高くした十字の迷路(手順3: 重度ストレス)後。順応期間中、各マウスは、4日間(96時間)、無制限に供給される栄養物及び水の存在下で隔離される。マウスの体重及び消費された食物の重量が、基準を確立するために、同じ時刻に毎日測定される。4日目に、尻尾の小型の切開が行われる。次に注射及び葛藤テスト前の血漿コルチコステロン率を分析するために、採血が10分間行われる。一段高くした十字の迷路も、コルチコステロン率の増加を誘発するので、ストレス誘導物質になる(Rodgers et al., 1999)。切開は、テスト室と異なる部屋で行われ、この作業前には、尻尾切開及び固定化以外にあらゆるストレスを回避するためのあらゆる有効な予防策が取られた。得られた血液試料は、10000回転/分で10分間遠心分離され、かつ血漿は、後で定量されるまで-80で貯蔵される。コルチコステロンは、放射免疫測定技術(ICN Clinical Sciences)の使用により定量される。一旦採取が終了すると、動物は、実験室に置かれる。

【0082】

5日目に動物は、9でNaClの腹腔内注射(i.p.)を受ける。注射は、一段高くした十字の迷路にマウスを置く10分前になされる。動物は、NaClにより処置される野生(n=8)及びNaClの注射を同様に受ける突然変異(n=12)マウスの2つの実験グループに分割される。マウスは、注射の10分後に一段高くした十字の迷路の中央に置かれる。尻尾の小型の切開が、テスト後30分に改めて行われ、その時にコルチコステロン率は、最大に達し、かつ4時間高い状態にとどまる(Natelson et al., 1987)。テストに続き、食物摂取の2つの連続した算定が、テスト開始3時間後に行われる。

【0083】

「オープンフィールド」後。「オープンフィールド」に直面することを開始した3時間後に食物摂取を算定するために、我々は、手順2の場合と同様に手続きを行った。その上、我々は、手順2及び3の1ヵ月後、マウスの運動活動を算定した。

【0084】

薬物投与後。野生及び5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスを処置するために使用される各薬物は、NaCl(0.9%)の塩水中で即時に希釈され、かつ全身注射された(i.p.)。各処置の注射量は、30gに対して200μLである。野生又は5-HT₄受容体に関して無効にされたマウス(n=35)は、次の処置を受けた：NaCl、MDMA(又は「エクスタシー」又は3,4-N-メチレンジオキシメタンフェタミン、SIGMA、10mg/kg)、RS 39604、RS 102221/MDMA。

【0085】

MDMA(10mg/kg、Sigma、使用免許9900431 S、V. Comp an)及び5-HT₄受容体の拮抗薬、RS 39604(0.5mg/kg)は、野生又は5-HT₄受容体を失ったマウス(遺伝子型及び薬理学的生成物当たり、n=12-17)において、単独で、又は組み合わせられた処置で投与された。RS 39604に関して0.5mg/kgの分量が、選択された。なぜならば、その投与が、無制限に食料を与えた野生マウスにおいて、食物摂取の増加を誘発し、NaCl又は様々な分量のRS 39604(0.01; 0.1; 1及び10mg/kg; 図示せず)により処置されたマウスの比較で、5-HT₄受容体に関する突然変異動物において、効果がない状態にとどまる。

【0086】

野生マウス及び5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスの食物摂取は、Lucas et al., 1998によって記載された実験手順に従って算定された。異なるマウスが、無制限に供給される栄養物及び水の存在下で、3日間の順応期間中に隔離され、その期間中にマウスの体重及び消費された食物が、毎日同じ時刻に測定される。4日目に、マウスは、24時間、その栄養物を喪失した。食物摂取に関する様々な処置の効果を決定するために、栄養物喪失期間後に、NaClのように薬物が、注射される。栄養物は、他の処置のための10分の間隔後に、各檻に再導入される。次に3回の連続した栄養物計量が、栄養物の再導入後30分、1時間及び3時間に行われる。

【0087】

c. 葛藤テスト。

一段高くした十字の迷路は、直角(90°)に沿って固定される長方形の2つの領域(L: 57cm、l: 5cm)から構成される。2つの領域の一方は、高さ15cmの壁を有し、かつ「閉鎖アーム」と名付けられる。壁を有さない他方の領域は、「開放アーム」と呼ばれる。この装置は、地面の上30cmの高さで台座に置かれる。実験室中の30分の順応期間後に、各動物は、2つの領域の交差点に置かれ、かつ実験者が居合わせずに5分間撮影される。データ分析は、マウスが開放又は閉鎖アームに入った数及び過ごした時間、中央で過ごした時間、及び動物が開放アームにいる時に地面に頭部を傾けた(「ヘッドディップ」)回数の算定からなる。テスト中に置かれると、マウスは、新規環境の探検及び開放空間及び高さの恐怖の間で葛藤に直面する。因子分析により、一方は、不安に関連し、かつ他方は、運動活動に関連する(Brunner et al., 1999)2つのタイプの行動を明らかにされる。マウスは、夜行性動物であるので、不安な動物が、閉鎖アーム中にしばしば戻り、かつ長期間とどまり、かつ開放アームに関しては逆であることが、一般に認められる。

【0088】

「オープンフィールド」は、壁が30cmの高さである43.2×43.2cmの領域である。赤外線センサが、互いに1.5cmの距離で4辺に配置され、このようにしてマウスの身長に適應する。走行距離の記録は、動物が実験装置の中央に置かれる瞬間から30分間、ソフトウェア(MED、Associates Activity Monitor)によって行われる。この手順は、続けて3日反復される。このように、この新規環境へのマウスの順応能力を算定することが、可能である。実験者は、記録中に実験室に居合わせない。赤外線の時盤の目により、幾つかの変数の微妙な分析を行うことが可能にな

10

20

30

40

50

る。

【0089】

II. 結果。

II. 1. 拒食症誘発性ストレス：拘束ストレス又は強制固定化に対する、5-HT₄受容体を失ったマウスの低感受性。

拒食症研究の実験モデルとして提案された(Rybkin et al., 1997, Harris et al., 2002)、拘束ストレスは、ストレス後に食物を消費しない、5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスの抵抗限界をテストするために使用された。食物摂取及び体重増加の変動は、8日間の順応期間中及び10日間の回復期間中に測定された(図4)。

10

【0090】

8日間の隔離期間(順応期間)中、5-HT₄受容体を有さないマウスの食物摂取は、野生マウスのそれと異ならなかった。順応期間中のその体重増加の変動は、遺伝子型及び時間の間の有意相互作用が示すように、野生動物のそれよりも低かった($F_{1,360} = 2.45$; $p < 0.05$)。換言すれば、突然変異マウスの体重増加のいかなる有意変動も、検出されなかった($F_{39,186} = 0.94$)。他方で、野生マウスにおいては、増大した($F_{29,174} = 4.45$; $p < 0.001$)。8日目に固定化されるように又はされないようにプログラムされた、同じ遺伝子型の2つの動物グループの間の体重増加の変化又は食物摂取は、著しく異ならなかった(図4a、b)。

【0091】

拘束ストレス後に、統計分析(ANOVA反復測定)は、時間中の食物摂取に対するストレスの有意効果($F_{9,567} = 13.99$; $p < 0.0001$)及び遺伝子型×時間の有意相互作用($F_{9,549} = 2.2$; $p < 0.05$)を示した。分析(「二方向」ANOVA)も、食物摂取の低下を誘発する拘束ストレスの能力が、ストレスに続く最初の24時間に遺伝子型によって決まること($F_{1,61} = 6.73$; $p < 0.05$)を同様に示した。食物消費は、ストレスを加えられない同じ遺伝子型のマウスと比較して、野生マウスにおいて著しく減少し(-36.4%、図4a)、かつ突然変異マウスにおいてごく僅かな傾向にあった(-19.6%、図4b)。最も詳細な分析は、5-HT₄受容体を失ったマウスが、固定化後24時間に、野生マウスよりも多くの食物を著しく消費したことを示した(+24%、 $p < 0.05$)。48時間後、野生マウスのみが、対照動物に対して少ない食物を依然として消費する(-16.4%、図4a)。突然変異マウスの食物摂取に対するストレスのいかなる有意効果も、強制固定化の48時間後に検出されなかった(図4b)。

20

30

【0092】

並行して、統計分析(ANOVA反復測定)は、時間中の体重増加の変動に対するストレスの有意効果($F_{9,522} = 11.33$; $p < 0.0001$)及び遺伝子型×時間の有意相互作用($F_{9,522} = 2.38$; $p < 0.05$)を示した。統計分析(ANOVA反復測定)は、拘束ストレスが、野生マウスにおいて体重増加の著しい低下を誘発した($F_{1,252} = 5.76$ 、 $p < 0.05$ 、図4c)が、受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスにおいては誘発しなかった($F_{1,270} = 0.014$ 、図4d)ことを示した。詳細な統計分析は、ストレスが、対照マウスと比較して、回復期間の最初の4日に野生マウスにおいて体重増加の低下をもたらしたことを示した(図4c)。反対に、拘束ストレスは、体重増加が安定した状態にとどまり、かつ固定化後24時間中にストレスを加えられた同属種と比較してより低いので、5-HT₄受容体の不在下でごく僅かな効率を有した(図4d)。

40

【0093】

更に、出願人の結果は、拘束ストレスが、野生雌の強制固定化後に、5-HT₄受容体の拮抗薬である、RS39604注射に先行されるならば、野生マウスの食物摂取が、変更されないことを示した(図示せず)。換言すれば、5-HT₄受容体の薬理学的不活性化は、拘束ストレスの拒食症誘発性効果を除去した。並行して、RS39604投与は、

50

NaClによって処置された動物と比較して、野生マウスの体重損失を減少させた（図示せず）（Compan et al., 2003）。

【0094】

II. 2. 漸増強度の拒食症誘発性ストレスに対する5-HT₄受容体を失ったマウスの低感受性。

この結果は、5-HT₄受容体を失った成体マウスが、新規環境の拒食症誘発性効果に低い感受性を示したことを示す（図5）。統計分析は、遺伝子型（ $F_{1, 47} = 5.57$ ； $p < 0.05$ ）及び使用した手順（ $F_{1, 47} = 18.55$ ； $p < 0.0001$ ）の有意効果を示した。

【0095】

常用する檻から、食物摂取算定の檻へのマウスの単純な移転は、野生及び突然変異マウスの食物消費を変更しなかった（手順1、図5）。中程度ストレス（手順2）、視床下部-下垂体軸の活性を増大させることで知られている、5分間、一段高くした十字の迷路中に1回のみ露出させることは、野生マウスにおいて、食物摂取の著しい減少を誘発した（ -33.4% ； $p < 0.05$ ； $n = 7$ ）。このことは、突然変異マウスに関しては当てはまらなかった（図5、 $n = 9$ ）。5-HT₄受容体を有さないマウスの食物消費は、中程度のストレス後に野生動物よりも著しく高かった（ $+48.4\%$ ； $F_{1, 15} = 7.97$ ； $p < 0.05$ ； $n = 10$ ；図5）。その他の一群の動物を使用すると、我々の結果は、強いストレス（手順3）が、手順2によって処置されたマウスと比較して、野生マウスにおいて、食物摂取の大きな減少を引き起こしたことを示す（ -78% ； $F_{2, 19} = 16.11$ ； $p < 0.0001$ ； $n = 8$ ；図5）。5-HT₄受容体の不在下でも食物摂取が減収するとしても、突然変異マウスは、強いストレス後に野生動物よりも多くの食物を消費する（ $+132\%$ ； $F_{1, 22} = 6.7$ ； $p = 0.0042$ ；図5； $n = 10$ ）。

【0096】

II. 3. 5-HT₄受容体の欠如又は不活性化は、MDMA又は「エクスタシー」投与によって誘発される、食物を消費する動機阻害を阻む。

食物摂取の全体的統計分析は、遺伝子型（ $F_{1, 105} = 4.86$ ； $p < 0.05$ ）、処置（ $F_{1, 105} = 7.24$ ； $p < 0.001$ ）及び時間（ $F_{3, 315} = 390.12$ ； $p < 0.0001$ ）の有意効果を示す。遺伝子型及び処置間（ $F_{3, 105} = 2.76$ ； $p < 0.05$ ）、及び時間因子及び処置間（ $F_{9, 315} = 29.30$ ； $p < 0.0001$ ）の相互作用も、同様に有意である。

【0097】

MDMAの場合に、統計分析は、それぞれ時間中に変動する（ $F_{3, 177} = 3.97$ ； $p < 0.01$ ）及び（ $F_{3, 177} = 53.12$ ； $p < 0.0001$ ）、遺伝子型（ $F_{1, 59} = 11.93$ ； $p < 0.001$ ）、及び処置（ $F_{1, 59} = 15.78$ ； $p < 0.001$ ）の有意効果を示す。我々の結果は、MDMA投与が、NaClによって処置された同じ遺伝子型の齧歯目と比較して、野生マウスにおいて、食物摂取の著しい減少を誘発したことを示す（図6）。この効果は、その投与後30分（ -95.38% 、図6A）及び1時間（ -88.56% 、図6B）で観察され、かつ3時間では不在である（図6C）。NaClによって処置された突然変異齧歯目と比較して、5-HT₄受容体を有さないマウスにおいて、MDMAは、その投与後30分（ -69.07% 、図6A）及び1時間（ -68.49% 、図6B）で、食物摂取の著しい減少を同様に誘発する。この効果は、マウスの処置後3時間ではもはや観察されない（図6C）。更に、5-HT₄受容体を有さないマウスにおける食物消費は、同じ処置を受けた野生動物と比較して、MDMA投与後1時間（ $+645.56\%$ ； $p < 0.001$ 、図6B）及び3時間（ $+244.23\%$ ； $p < 0.05$ 、図6C）で著しく高い。

【0098】

5-HT₄受容体の拮抗薬であるRS 39604に関して、統計分析は、遺伝子型（ $F_{1, 63} = 1.37$ ）も、処置（ $F_{1, 63} = 3.93$ ）も、遺伝子型及び処置の有意因子の間の相互作用（ $F_{1, 63} = 3.93$ ）の効果も示さない（図6）。

【0099】

5-HT₄受容体の選択的拮抗薬であるRS39604に組み合わされたMDMAの場合に、統計分析は、時間中 ($F_{3, 165} = 68.87$; $p < 0.0001$) の処置の有意効果 ($F_{1, 55} = 7.10$; $p < 0.05$) を示す。我々の結果は、MDMA及びRS39604の組み合わせた投与が、NaClによって処置された同じ遺伝子型の齧歯目と比較して、野生マウスにおいて、食物摂取の著しい減少を誘発したことを示す。この効果は、MDMA/RS39604の投与後30分 (-83.72%、図6A) 及び1時間 (-64.89%、図6B) で観察される。動物の処置後3時間には、食物摂取のいかなる変動も観察されない (図6C)。我々の結果は、5-HT₄受容体を有さないマウスにおいて類似する。MDMA/RS39604投与は、同じ遺伝子型のマウスと比較して、MDMA/RS39604注射後30分 (-82.19%、図6A) 及び1時間 (-72.88%、図6B) で、食物消費を著しく減少させ、かつ3時間では効果がない (図6C)。更に、我々の結果は、野生マウスの食物摂取が、MDMAのみを受けた野生動物よりも、MDMA/RS39604投与後1時間 (+206.82%、図6B) 及び3時間 (+51.18%、図6C) で著しく高いことを示す。この効果は、5-HT₄受容体に関する突然変異マウスにおいて示されない。

10

【0100】

II.4. 「オープンフィールド」における5-HT₄受容体に関する突然変異マウスの新規な事物への反応。

図7に示した結果は、突然変異マウスが、その露出の1日目のみ、野生動物よりも「オープンフィールド」において著しく少ない距離を走行することを示す ($F_{1, 14} = 6.76$; $p < 0.05$)。2つの遺伝子型間のいかなる有意差も、露出2日目及び3日目に検出されなかった。5-HT₄受容体を失ったマウスは同様に、「オープンフィールド」における露出1日目 ($F_{1, 14} = 5.50$; $p < 0.05$) 及び2日目 ($F_{1, 14} = 4.50$; $p < 0.05$) にその野生同属種と比較して、中央に著しく短い時間とどまる。このことは、突然変異マウスにおいて、より高い不安レベルを示唆する (図7e)。垂直活動に関して2つの遺伝子型間のいかなる有意差も検出されず (図7f)、このことは、突然変異マウスが、探検活動欠陥を有さないことを示す。

20

【0101】

これらのデータは、野生マウスと比較して5-HT₄受容体を失ったマウスの新規な事物への反応性及び/又は歩行活動の減少を示す (図7)。

30

【0102】

II.5. 5-HT₄受容体を失ったマウスの不安レベルの研究。

危険な類似にもかかわらず、発明者は、過食症患者における不安及び食物障害の変動の共存を考慮に入れた。その場合、5-HT₄受容体を失ったマウスの「不安」状態の変動が、拒食症誘発性ストレスが加わるにもかかわらず、食物を執拗に消費し続けることに関連し得るか、分析した。

【0103】

このために、領域又は閉鎖及び開放アームから構成される一段高くした十字の迷路を使用した。齧歯目が、閉鎖アーム中を通過し、かつ入るほど、「不安である」ように見なされる。主要な結果は、手順3 (強いストレス) は、手順2 (中程度のストレス) と比較して、経過時間又は閉鎖アームに入った数の著しい上昇を誘発したことを示している (図8)。探検活動の指数である「ヘッドディップ」数のみが、野生マウスにおける手順2と比較して、手順3後に著しく減少する (図8)。これらの結果は、5-HT₄受容体を有さないマウスが、野生マウスに対して嫌悪状況 (手順3) においてより高い「不安」レベルを有することを示唆している。

40

【0104】

その上、野生マウスに対する手順2 (迷路のみ) の場合に、突然変異マウスの開放及び閉鎖アーム中に入った総数の著しい減少は、歩行活動及び/又は新規な事物への適応欠陥の低下を示唆する。

50

【 0 1 0 5 】

ストレス影響下での食物行動研究は、歩行活動の影響を考慮せずに検討され得るように見えない。その増加は、明白に、より高いエネルギー欲求、及びこのようにしてより強い食物消費に関連し得、かつその逆も当てはまる。

【 0 1 0 6 】

一段高くした十字の迷路の使用により得られるデータに関連した、新規な事物（上記 I I . 4 . ）への反応の研究の際に得られるデータは、5 - H T ₄ 受容体の刺激が、歩行活動の増大及び / 又は新規環境に直面するその反応性の適応しない増大に関連することを示唆している。この仮説は、嗜癖における 5 - H T ₄ 受容体の可能な関与の仮説を強化する。

10

【 0 1 0 7 】

I I I . 考察

3つのタイプの分子メカニズムが、5 - H T ₄ 受容体を失ったマウスに関して、拒食症誘発性ストレスへの抵抗を与えることが可能である。

【 0 1 0 8 】

I I I . 1 . 突然変異マウスにおいて食物摂取を十分に阻害するために、ストレスに適応することが、セロトニン作動性系にとって不可能であること。

従って発明者は、5 - H T ₄ 受容体の不在下でストレスを加えた後のセロトニン作動性伝達の欠陥の仮説を重視した。強制固定化は、野生マウスのみにおいて細胞外 5 - ヒドロキシインドール酢酸（5 - H I A A ）率の上昇をもたらした。換言すれば、5 - H T の主要代謝物質率は、5 - H T ₄ 受容体の不在下で不変のままである。

20

【 0 1 0 9 】

このように、拒食症誘発性ストレスに対する突然変異マウスの低感受性は、細胞外 5 - H I A A 率の変更の欠如に立脚し得る（図 9 ）。

【 0 1 1 0 】

I I I . 2 . 突然変異マウスにおいて C A R T ペプチドをコードする m R N A の発現増大。

野生マウスと比較して、側坐核及び / 又は視床下部で突然変異マウスにおいて観察される、C A R T（「コカイン - アンフェタミン関連転写」、M D M A 実験パラダイム）ペプチド（図示せず）をコードする m R N A の発現増大は、次の仮説を表明することを可能にする：5 - H T ₄ 受容体のリガンド全体は、その C A R T ペプチド発現の制御のために、食物消費を制御することが可能である。

30

【 0 1 1 1 】

このペプチドの投与は、側脳室又は視床下部核へのそれぞれの投与に応じて、拒食症誘発性及び食欲促進効果を誘発し得る。

【 0 1 1 2 】

I I I . 3 . 突然変異マウスにおいて検出されたレプチン率の低下。

5 - H T ₄ 受容体に関して無効にされたマウスにおいて検出されたレプチン率の低下（図 9、実験パラダイム M D M A ）は、レプチン率の制御により 5 - H T ₄ 受容体のリガンドが、食物消費及び体重の変動を調整し得ることを、提案することを可能にする。

40

【 0 1 1 3 】

レプチン率変動の統計分析は、M D M A による処置の有意効果を示さなかった（ $p = 0 . 9 5$ ）。これらの結果は、M D M A の唯一の投与が、野生又は突然変異マウスにおいて、レプチン率を変えないことを示す（図 9 ）。

【 0 1 1 4 】

5 - H T ₄ 受容体をコードする遺伝子の不在下で、レプチン率変動の統計分析は、遺伝子型の有意効果を示す（ $F_{1, 27} = 10 . 42$; $p < 0 . 01$ ）。これらの結果は、レプチン率が、シェッフェのテスト F の使用が同様に示すように（ $p < 0 . 01$ ）、野生動物（- 21 %）と比較して、5 - H T ₄ 受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスにおいて、著しく高くないことを示す（図 9 ）。

50

【0115】

III. 4. 結論。

ストレスの拒食症誘発性効果は、第1のリンクが、視床下部 - 下垂体軸の活性増大である、事象カスケードに立脚するであろう。その結果、食物摂取を阻害するモノアミン(5-HT及びDA)の伝達が上昇することになる。現在の知識状況では、5-HTのいかなる受容体も、5-HT_{2A/2C}受容体に対する唯一の薬理学的研究(Grignaschi et al., 1993)を除き、ストレスの拒食症誘発性効果の原因である分子要素に相当するとして示されなかった。5-HT_{2C}受容体に関する突然変異マウスの体重は、拘束ストレスを反復して加える結果、野生マウスのそれに比較し得るように減少することが、ごく最近報告された(Clifton et al., 2003)。

10

【0116】

行動結果は、拒食症誘発性ストレスに対する、5-HT₄受容体を有さないマウスの低感受性を明らかにし、食物消費に対する5-HTの阻害制御を確認する。それらは、5-HT₄受容体が、伝達物質の1つであるストレスの拒食症誘発性効果に5-HTが寄与するという仮説を強化する。5-HT₄受容体の不在下で、NAc及び視床下部におけるセロトニン作動性パラメーターの変更を考慮すると、ストレスは、ストレス後に突然変異マウスの食物摂取を減少させるために十分な比率で、5-HTの放出を増大させないことが、その場合可能である。

【0117】

データは、5-HT₄受容体の活性化の結果、5-HT放出の正の対照に有利である。5-HT₄受容体の刺激は、カリウムイオンチャネルの閉鎖を誘発し(Bockaert et al., 1998)、このことは、ニューロンの興奮性を維持し、かつ神経伝達物質の放出を増大させることが可能である。このデータを踏まえると、5-HT₄受容体の刺激は、海馬における細胞外5-HT率上昇に至らせる(Ge & Barnes, 1997)。(ストレスのない)基礎条件において、このデータは、視床下部及びNAc中の5-HIAA/5-HT比率の上昇を示し、このことは、5-HT₄受容体の不在下で、5-HT代謝の変化を示唆する。その上、これらの結果は、トリチウム化シタロプラムによってマーキングされた5-HTの膜輸送体密度は、NRDにおいて最も高いのであるが、ストレス後の視床下部中の5-HT率の可能な低下が、5-HT₄受容体を失ったマウスにおいて補償されないであろうことを示唆している。

20

30

【0118】

興味深いことに、遺伝的無効化がマウスを肥満にするレプチンは、視床下部において5-HTの再生率(Calapai et al., 1999; Hastings et al., 2002)、並びに前頭皮質において5-HTを捕獲する輸送体の濃度(Charnay et al., 1999)を増大させ得る。更に、レプチンをコードする遺伝子の無効化は、NRD中で5-HTの膜輸送体をコードするmRNAの率減少を誘発する(Collin et al., 2000)。マウスの正中縫線核(Finn et al., 2001)及びNRDのセロトニン作動性ニューロンに対するレプチン受容体の局在化は、レプチン及びセロトニン作動性ニューロンの間の相互作用に有利な追加論拠となっている。MDMA使用の同じ実験パラダイムにおいて、この結果は、レプチン率が、突然変異マウスにおいて減少することを示す。その上、MDMA注射は、レプチン血症の変動を誘発しなかった。これらのデータは、5-ヒドロキシトリプトファン投与によって誘発されるレプチン上昇を踏まえて、24時間の絶食後、5-HT₄受容体の活性化の結果のレプチン率の正の対照を示唆している(Yamada et al., 1999)。しかしながら、レプチン率は、5-HT_{1B}(Bouwknicht et al., 2001)又は5-HT_{2C}(Nonogaki et al., 1998)受容体に関して突然変異マウスにおいて変更されない。このデータは、レプチン血症が、野生マウスと比較して、拘束ストレス前及び後で5-HT₄受容体を失ったマウスにおいて低いことを示す。レプチン率の上昇は、コルチコステロンのそれに続くので(Guerre-Millo, 1997)、この結果は、レプチン血症に対する栄養物喪失ストレスの効果が、5-

40

50

HT₄受容体の不在下で効力がなくなること示唆する；その結果、拒食症誘発性ストレスに対する、5-HT₄受容体に関して無効にされたマウスのより強い抵抗力が生じるであろう。

【0119】

レプチンは、視床下部室傍核中のCARTペプチド発現を活性化するので(Kristensen et al., 1998)、5-HT₄受容体に関して無効にされたマウスの視床下部におけるCARTペプチドの可能な変動は、野生マウスと比較して、分析中である。食物消費の調整におけるその関与は、その注射部位に従って可変である。このようにして、CARTペプチドの側脳室内投与は、拒食症という結果になり(Kristensen et al., 1998)、他方で視床下部中の組織内投与は、食欲亢進をもたらす(Abbott et al., 2001)。Abbott et al.によって記載された(2001)視床下部室傍核中のCARTペプチド注射の食欲亢進効果は、Stanley et al. (2001)の意見書によって反論された。発明者の結果は、NAcの「シェル」へのCARTペプチド注射が、MDMA使用の同じ実験パラダイムにおいて食欲を減少させることを示している。従って結果全体は、MDMAが、CARTペプチド発現の正の調整およびその放出を引き起こす5-HT₄受容体の活性化により食欲を阻害することを示唆している。幾つかのデータが、かかるメカニズムに有利な論拠を構成する。すなわち(1)5-HT₄受容体は、GABAを含むニューロン上に局在化される(Compan et al., 1996)、(2)CARTペプチドは、NAcニューロン中でGABAと共存する(Scearce-Levie et al., 1999、Scearce-Levie et al., 2001)；(3)ここに示した結果は、NAcの「シェル」中のタンパク質CARTペプチド/5-HT₄受容体及びmRNA発現の局所共存を示唆する。しかしながら、これらの各処置後の細胞共存及びNAc中のペプチド濃度の算定は、これから確立せねばならない。

【図面の簡単な説明】

【0120】

【図1】トランスジェニックマウスを得るために設置される技術部門の目標の略図である。

【図2】セロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子の無効化を示す。図2Aは、セロトニンの5-HT₄受容体の膜間領域II及びIIIをコードするDNA断片(6.5 kb)の略図である(エクソンIII)。DNA配列(P)は、野生マウスにおいて4 kbのDNA分解酵素I断片をハイブリダイズするための外部プローブを示す。図2Bは、クローニングベクターの略図である。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(Neo)をコードする遺伝子の発現は、プロモーター(「ホスホグリセリン酸キナーゼIプロモーター：pGK」)の制御下にある。それは、5-HT₄受容体の膜間領域IIIをコードするDNA配列において酵素制限部位Xbaに挿入された。その場合外部プローブによってハイブリダイズされ得るDNA分解酵素I断片の寸法は、3.5 kbであり、かつ突然変異DNAを同定することを可能にする。図2Cは、酵素Iの使用によって予め消化され、かつ外部プローブ(P)によってハイブリダイズされた、株胚細胞の、ゲノムDNAの「サザンブロット」である。

【図3】セロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスが、その短い発育期間中に、僅かに増大した体重増加を有することを示す。体重増加は、発育の所定の日(21~56)に測定された体重及び生後20日目のその間の差である。データは、1日当たりのgで表現される体重増加の変動の平均±平均値の標準誤差である。体重は、毎日、野生(+ / +) 21例及び突然変異(- / -) 15例の平均数からなり、1年で生まれた群から、離乳前20日目、及び生後の生殖能獲得の56日目の間で測定された。統計分析は、突然変異マウスの体重増加が、27日目(+16%、F_{1, 72} = 6.54；n = 40 + / +、n = 34 - / -)、28日目(+12%、F_{1, 67} = 4.73；n = 42 + / +、n = 27 - / -)、29日目(+30%、F_{1, 72} = 6.54；n = 23 + / +、n = 18 - / -)、30日目(+21%、F_{1, 72}

10

20

30

40

50

= 6.54 ; n = 20 + / +、n = 19 - / -)、36日目 (+12%、 $F_{1,40}$ = 4.06 ; n = 22 + / +、n = 20 - / -)、及び37日目 (+13%、 $F_{1,40}$ = 6.18 ; n = 25 + / +、n = 17 - / -)のみ、野生動物のそれより著しく高いことを示した。他の日に関して、2つの遺伝子型の間に、いかなる有意差も検出されなかった。遺伝子型間の有意差は、* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ によって示される。

【図4】セロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスが、拘束ストレス又は強制固定化の後に、異常な体重増加及び食物摂取反応を有することを示す。図4a及び4bは、野生(図4a)及び突然変異(図4b)マウスにおける一日の食物摂取を示す。一日の食物摂取は、連続する2日間に算定される栄養量の間の差である。データは、順応期間(8日)及び回復期間(10日)中に算定される。110分の急性拘束ストレスを、8日目に加える(矢印)。この強制固定化は、2日間の回復期間中、野生マウスにおいて、食物摂取の減少を誘発した(図4a)。この拒食症誘発能力は、5-HT₄受容体を有さないマウスにおいて、効果が低い(図4b)。図4c及び4dは、順応期間の(サイクルの9:00の照明部分)隔離1日目からの野生(図4c)及び突然変異(図4d)マウスの体重増加の一日の変動を示す。拘束ストレスは、野生マウスの体重増加の高い減少をもたらしたが(c)突然変異マウスにおいては、減少が遥かに少ないか、無かった(d)。データは、ストレスを加えない(n = 14)又は拘束(n = 18)の野生マウス及びストレス無し(n = 17)又は固定化した(n = 16)突然変異動物の群の平均±平均値の標準誤差(g/日)である。ストレスを加えた又は加えない動物の間の有意差は、§§§ $p < 0.0001$; §§ $p < 0.001$; § $p < 0.05$ によって評価される。2つの遺伝子型間の有意差は、* $p < 0.05$ 、及び遺伝子型×ストレスの有意相互作用は、# $p < 0.05$ によって示される。

【図5】セロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスが、漸増強度の拒食症誘発性ストレス後に、野生動物よりも多くの食物を消費することを示す。換言すれば、状況が、徐々にストレスを生じさせる実験パラダイムは、野生マウスにおいて食物摂取の減少を誘発したが、他方で、拒食症誘発性効果は、5-HT₄受容体をコードする遺伝子の不在で減少した。データは、齧歯目に関する新規及び/又は嫌悪実験状況での食物摂取の平均±平均値の標準誤差(g)を示す(手順1:3時間の隔離、手順2:一段高とした十字の迷路(EPM、5分)及び3時間の隔離、手順3:96時間の隔離、尻尾の小型切開、NaCl注射及び、EPM)。5-HT₄受容体を有さないマウス及び野生マウスの間の有意差は、* $p < 0.05$ によって示される。各手順間の有意差は、§ $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$ によって評価される。

【図6A】セロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスは、栄養物喪失後24時間のMDMA又は「エクスタシー」の拒食症誘発性効果に感受性が低いことが判明することを示す。「エクスタシー」の拒食症誘発性ストレスへのこの抵抗は、それがセロトニンの5-HT₄受容体の選択的拮抗薬(RS 39604)と一緒に投与されるならば、再生される。換言すれば、「エクスタシー」注射によって誘発される食物を消費する動機的大幅な緩和は、24時間の栄養物喪失にもかかわらず、5-HT₄受容体の欠如又は阻害によって阻まれる。データは、野生(+ / +)又は5-HT₄受容体を失った(- / -)マウスにおいて、NaCl、MDMA(10mg/kg)及び/又はRS 39604(0.5mg/kg)の注射後30分(図6A)、1時間(図6B)及び3時間(図6C)で測定した食物再摂取の平均±平均値の標準誤差(g)を示す。* $p < 0.05$ 、シェッフエ(Scheffe)のテストFを伴った分散分析後の遺伝子型の有意効果。§ $p < 0.05$; §§ $p < 0.001$; §§§ $p < 0.0001$ 、NaClによって処置された同じ遺伝子型の動物との比較による処置の有意効果(Anova、シェッフエのテストF)。# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ 、MDMAによって処置された野生動物との比較による処置の有意効果(Anova、シェッフエのテストF)。

【図6B】セロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウ

スは、栄養物喪失後24時間のMDMA又は「エクスタシー」の拒食症誘発性効果に感受性が低いことが判明することを示す。「エクスタシー」の拒食症誘発性ストレスへのこの抵抗は、それがセロトニンの5-HT₄受容体の選択的拮抗薬(RS 39604)と一緒に投与されるならば、再生される。換言すれば、「エクスタシー」注射によって誘発される食物を消費する動機的大幅な緩和は、24時間の栄養物喪失にもかかわらず、5-HT₄受容体の欠如又は阻害によって阻まれる。データは、野生(+ / +)又は5-HT₄受容体を失った(- / -)マウスにおいて、NaCl、MDMA(10 mg / kg)及び/又はRS 39604(0.5 mg / kg)の注射後30分(図6A)、1時間(図6B)及び3時間(図6C)で測定した食物再摂取の平均±平均値の標準誤差(g.)を示す。

* p < 0.05、シェッフエ(Scheffé)のテストFを伴った分散分析後の遺伝子型の有意効果。§ p < 0.05; §§§ p < 0.001; §§§§ p < 0.0001、NaClによって処置された同じ遺伝子型の動物との比較による処置の有意効果(Anova、シェッフエのテストF)。# p < 0.05; ## p < 0.01、MDMAによって処置された野生動物との比較による処置の有意効果(Anova、シェッフエのテストF)。

【図6C】セロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスは、栄養物喪失後24時間のMDMA又は「エクスタシー」の拒食症誘発性効果に感受性が低いことが判明することを示す。「エクスタシー」の拒食症誘発性ストレスへのこの抵抗は、それがセロトニンの5-HT₄受容体の選択的拮抗薬(RS 39604)と一緒に投与されるならば、再生される。換言すれば、「エクスタシー」注射によって誘発される食物を消費する動機的大幅な緩和は、24時間の栄養物喪失にもかかわらず、5-HT₄受容体の欠如又は阻害によって阻まれる。データは、野生(+ / +)又は5-HT₄受容体を失った(- / -)マウスにおいて、NaCl、MDMA(10 mg / kg)及び/又はRS 39604(0.5 mg / kg)の注射後30分(図6A)、1時間(図6B)及び3時間(図6C)で測定した食物再摂取の平均±平均値の標準誤差(g.)を示す。

* p < 0.05、シェッフエ(Scheffé)のテストFを伴った分散分析後の遺伝子型の有意効果。§ p < 0.05; §§§ p < 0.001; §§§§ p < 0.0001、NaClによって処置された同じ遺伝子型の動物との比較による処置の有意効果(Anova、シェッフエのテストF)。# p < 0.05; ## p < 0.01、MDMAによって処置された野生動物との比較による処置の有意効果(Anova、シェッフエのテストF)。

【図7】セロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスが、新規環境、ここでは「オープンフィールド」で歩行運動及び/又は適応の欠陥を有することを示す。データは、30分間及び連続した3日間(1から3日目)の「オープンフィールド」の面積全体(図7a及び7b)又は中央(図7c及び7d)での野生(+ / +、n = 7)及び突然変異(- / -、n = 7)マウスによる走行距離(cm)の平均を示す。図7eのデータは、連続した3日間の「オープンフィールド」中央で過ごした平均時間を示す。図7fは、連続した3日間の垂直活動の平均データを示す。遺伝子型間の有意差は、* p < 0.05によって、かつ異なる露出日の間は、§§ p < 0.01及び§ p < 0.05によって示す。

【図8】セロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされたマウスは、一段高くした十字の迷路(EPM)では良く反応せず(図8a)、他方でストレスを更に加えた状況で、突然変異マウスがより不安であることが判明した(図8b)ことを示す。EPMの区画全体に入る数は、5-HT₄受容体の不在で非常に著しく減少するので(平均±平均値の標準誤差、異なる研究室で3回再生される、遺伝子型当たりn = 8 - 9)、加えられる他のストレスがないEPMにおいて、マウスは、対照動物よりも短時間、開放アームに留まり(図8a)、かつ良く反応しない。ストレスを更に加えた状況で、突然変異マウスは、開放アームに低い頻度で留まり、かつ入ったので(平均±平均値の標準誤差、遺伝子型当たりn = 18 - 19)、新規環境に反応し始め、かつその野性同属種よりも不安な行動を示した。遺伝子型間の有意差は、* p < 0.05によって示される(

10

20

30

40

50

A n o v a)。

【図9】セロトニンの5-HT₄受容体をコードする遺伝子の欠如が、レプチン率の減少を誘発したことを示す。データは、平均して月齢6～10ヶ月の、野生(+ / +)又は5-HT₄受容体をコードする遺伝子に関して無効にされた(- / -)マウス(n = 8)において、NaCl(0.9%)又はMDMA(10mg / kg)の投与後、ng / mLで表わされる血漿のレプチン率の平均±平均値の標準誤差を示す。* * p < 0.01、シェッフェのテストFを伴った分散分析(ANOVA)後の遺伝子型の有意効果。

【0121】

(参考文献)

REFERENCES

- Abbott CR. Rossi M. Wren AM. Murphy KG. Kennedy AR.
Stanley SA. Zollner AN. Morgan DG. Morgan I. Ghatei MA.
- 5 Small CJ. Bloom SR. (2001) **Endocrinology**, 142, 3457-63.
- Ackerman S. Nolan LJ. (1998) **CNS Drugs.**, 9, 135-51.
- Adell A. Casanovas JM. Artigas F. (1997) 10
Neuropharmacology, 36, 735-741.
- Allison DB. Mentore JL. Heo M. Chandler LP.
- 10 Cappelleri JC. Infante MC. Weiden PJ. (1999) **J. Psychiatry**,
156, 1686-96.
- Amat J. Matus-Amat P. Watkins LR. Maier SF. (1998)
Brain Res., 812, 113-120.
- Barnes NM. & Sharp T. (1999) **Neuropharmacology**, 38,
15 1083-152. 20
- Barsh GS. Farroq IS. O'Rahilly S. (2000) **Nature**, 404,
644-51.
- Bockaert et al. (1997) **Handbook of Experimental
Pharmacology**, Vol. 129. Serotonergic Neurons and 5-HT
20 receptors in the CNS. Eds. H.G. Baumgarten and M. Göthert.
Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 439-474.
- Bockaert J. Ansanay H. Letty S. Marchetti-Gauthier E.
Roman F. Rondouin G. Fagni L. Soumireu-Mourat B. Dumuis A. 30
(1998) **C R Acad Sci III.**, 321(2-3), 217-21.
- 25 Bockaert J. Claeysen S. Sebben M. Dumuis A. (1998)
Ann N Y Acad Sci., 861, 1-15.
- Bockaert J. Claeysen S. Compan V. Dumuis A. (Revue,
2003, *sous presse*) 5-HT₄ receptor in CNS functions : are
they potential therapeutical targets ? **Drug Target.**
- 30 Bonasera SJ. Tecott LH. (2000) **Pharmacol Ther.**, 88 40
(2): 133-42.
- Bonhomme N. De Deurwaërdere P. Le Moal M. Spampinato
U. (1995) **Neuropharmacology**, 3, 4269-279.

- Bouwknicht JA. Van der Gugten J. Hijzen TH. Maes RA. Hen R. Olivier B. (2001) **Psychopharmacology**, 153(4), 484-90.
- Brunner D. Buhot, M-C. Hen R. Hofer M. (1999) **Behav Neurosci.**, 113, 587-601.
- Calapai G. Corica F. Corsonello A. Sautebin L. Di Rosa M. Campo GM. Buemi M. Mauro VN. Caputi AP. (1999) **J Clin Invest.**, 104, 975-82.
- Carlsson L. Amos GJ. Andersson B. Drews L. Duker G. Wadstedt G. (1997) **J Pharmacol Exp Ther.**, 282, 220-7.
- Casper RC. (1998) **Depress Anxiety**, 8, 96-104.
- Chaouloff F. (2000) **J. Psychopharmacol.**, 14, 139-151.
- Charnay Y. Cusin I. Vallet PG. Muzzin P. Rohner-Jeanraud F. Bouras C. (2000) **Neurosci Lett.**, 283, 89-92.
- Claeysen S. Sebben M. Becamel C. Parmentier M-L. Dumuis A. Bockaert J. (2001) **EMBO reports**, 21, 61-67.
- Clifton PG. Lee MD. Somerville EM. Kennett GA. Dourish CT. (2003) **Eur J Neurosci.**, 17, 185-90.
- Collin M. Hakansson-Ovesjo M. Misane I. Ogren SO. Meister B. (2000) **Brain Res Mol Brain Res.**, 81, 51-61.
- Compan V. Charnay Y. Daszuta A. Hen R. Bockaert J. (2003) **Comptes rendus de la Société de Biologie de Paris.**
- Cheng CHK. Costall B. Kelly M. Naylor RJ. (1994) **Eur J Pharmacol.**, 255, 39-49.
- Compan V. Daszuta A. Salin P. Sebben M. Bockaert J. Dumuis A. (1996) **Eur J Neurosci.**, 8, 2591-2598.
- Compan V. Dusticier N. Nieoullon A. Daszuta A. (1996) **Synapse**, 24, 87-96.
- Costall B. & Naylor RJ. (1997) **Br J Pharmacol.**, 122, 1105-1118.
- De Deurwaerdère P. L'Hirondel M. Bonhomme N. Lucas G. Cheramy A. Spampinato U. (1997) **J Neurochem.**, 68, 195-203.
- Di Chiara G. (1995) **Drug Alcohol Depend**, 38, 95-137.

- Donohoe TP. (1984) **Life Science**, 34(3), 203-218.
- Dourish CT. Hutson PH. Kennett GA. Curzon G. (1986) **Appetite**, 7 Suppl, 127-40.
- Dumuis A. Bouhelal R. Sebben M. Cory R. Bockaert J.
5 (1988) **Mol. Pharmacol.**, 34, 880-887.
- Erecius LF. Dixon KD. Jiang JC. Gietsen DW. (1996) **J
Nutri.**, 126, 1722-1731. 10
- Fairburn CG. Doll HA. Welch SL. Hay PJ. Davies BA.
O'Connor ME. (1998) **Arch Gen Psychiatry**, 55, 233-241.
- 10 Finn PD. Cunningham MJ. Rickard DG. Clifton DK.
Steiner RA. (2001) **J Clin Endocrinol Metab.**, 86, 422-6.
- Foltin RW. & Evans SM. (1999) **Pharmacol Biochem
Behav.**, 62, 457-64.
- Fontana DJ. Daniels SE. Wong EH. Clark RD. Eglen RM.
15 (1997) **Neuropharmacology**, 36, 689-96. 20
- Garrow J. (1991) **Br Med J.**, 303, 704-706.
- Ge J & Barnes NM. (1996), **Br J Pharmacol**, 117, 1475-
80.
- Ge J. Barnes NM. Costall B. Naylor RJ. (1997)
20 **Pharmacol Biochem Behav.**, 58, 775-783.
- Gerald C. Adham N. Kao HT. Olsen MA. Laz TM.
Schetcher LE. Bard JA. Vaysse PJ. Hartig PR. Branchek TA.
30 (1995) **EMBO J.**, 14, 2806-2815. 30
- Godart NT. Flament MF. Lecrubier Y. Jeammet P. (2000)
25 **Eur Psychiatry.**, 15, 38-45.
- Grignaschi G. Mantelli B. Samanin R. (1993) **Neurosci
Lett.**, 152, 103-6.
- Guerre-Millo M. (1997) **Biomed Pharmacother.**, 51, 318-
23.
- 30 Guy — Grand B. (1995) **Obes. Res.**, 4, 491S-496S. 40
- Harris RB. Mitchell TD. Simpson J. Redmann SM Jr.
Youngblood BD. Ryan DH. (2002) **Am J Physiol Regul Integr
Comp Physiol.** 282, R77-88.

- Hastings JA. Wiesner G. Lambert G. Morris MJ. Head G. Esler M. (2002) *Regul Pept.*, 103, 67-74.
- Heisler LK. Chu HM. Tecott LH. (1998) *Ann N Y Acad Sci.*, 15: 861:74-8.
- 5 Høbel BG. (1997) *Appetite*, 29, 119-133.
- Inoue T. Tsuchiya K. Koyama T. (1994) *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 49, 911-920.
- Jiang JC. & Gietzen DW. (1994) *Pharmacol Biochem Behav.*, 47, 59-63. 10
- 10 Joseph MH. & Kennett GA. (1983) *Brain Res.*, 270, 251-257.
- Joubert L. Claeysen S. Sebben M. Bessis AS. Clark RD. Martin RS. Bockaert J. Dumuis A. (2002) *J Biol Chem.*, 277, (28) 25502-11
- 15 Kelley AE. Swanson CJ. (1997) *Behav Brain Res.*, 89, 107-113. 20
- Kennett GA. Bright F. Trail B. Blackburn TP. Sanger GJ. (1997) *Neuropharmacology*, 36, 707-712.
- Konstandi M. Johnson E. Lang MA. Malamas M. Marselos M. (2000) *Pharmacol Res.*, 41, 341-346.
- 20 Koob GF. Nestler EJ. (1997) *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, 9, 482-497.
- Kristensen P. et al. (1998) *Nature*, 393, 72-6.
- Kucksmarski RJ. Flegal KM. Campbell SM. Jonhson CL. 25 (1994) *J Am Med Assoc.*, 272, 205-211. 30
- Lilenfeld LR. et al., (1998) *Arch Gen Psychiatry*, 55, 603-610.
- Lowry CA. Rodda JE. Stafford L. Lightman Ingram CD. (2000) *J. Neurosci.*, 20, 7728-7736.
- 30 Lucas G. Di Matteo V. De Deurwaerdère P. Porras G. Martin-Ruiz R. Artigas F. Esposito E. Spampinato U. (2001) *Eur. J. Neurosci.*, 13, 889-890.
- Lucas J. Yamamoto A. Scearce-Levie K. Saudou F. Hen R. (1998) *J Neurosci.*, 18, 5537-5544. 40

- Mc Mahon LR. & Cunningham KA. (1999) **J Pharmacol Exp Ther.**, 291, 300-307.
- Momose K. Inui A. Asakawa A. Ueno N. Nakajima M. Fujimiya M. Kasuga M. (1999) **Diabetes Obes Metab.**, 5, 281-284.
- Morley JE. Levine AS. Rowland NE. (1983) **Life Science**, 32, 2169-82.
- Nonogaki K. Strack AM. Dallman MF. Tecott LH. (1998) **Nat Med.**, 4(10), 1152-6.
- Pelleymounter MA. Cullen MJ. Baker MB. Hecht R. Winters D. Boone T. Collins F (1995) **Science**, 269(5223), 540-3.
- Phillips T.J. Hen R. Crabbe J.C. (1999) **Psychopharmacology** 147, 5-7.
- Price ML. Lucki I. (2001) **J. Neurosci.**, 21, 2833-2841.
- Rodgers RJ. Haller J. Holmes A. Halasz J. Walton TJ. Brain PF. (1999) **Physiol. Behav**, 68, 47-53
- Rybkin II. Zhou Y. Volaufova J. Smagin GN. Ryan DH. Harris RB. (1997) **Am J Physiol.** 273, R1612-22.
- Salamone JD. Cousins MS. Snyder BJ. (1997) **Neurosci Biobehav Rev.**, 21, 341-359.
- Samanin R. Garattini S. (1996) **Therapie**, 51, 107-15.
- Saudou F. Hen R. (1994) **Medical Chemistry Research**, 4, 16-84.
- Scearce-Levie K. Viswanathan SS. Hen R. (1999) **Psychopharmacology**, 141, 154-161.
- Scearce-Levie K. Coward P. Redfern CH. Conklin BR. (2001) **Trends Pharmacol Sci.**, 22, 414-20.
- Semenova TP. Ticku MK. (1992) **Brain Res.**, 588(2), 229-36.
- Sillaber I. Montkowski A. Landgraf R. Barden N. Holsboer F. Spanagel R. (1998) **Neuroscience**, 85, 415-425.

Silvestre JS. Fernandez AG. Palacios JM. (1996) **Eur J Pharmacol**, 309, 219-222.

Stanley SA. Small CJ. Murphy KG. Rayes E. Abbott CR. Seal LJ. Morgan DG. Sunter D. Dakin CL. Kim MS. Hunter R. 5 Kuhar M. Ghatei MA. Bloom SR. (2001) **Brain Res.**, 893, 186-94.

Steward LJ. Ge J. Stowe LR. Brown C. Bruton RK. Stokes PRA. Barnes NM. (1996) **J. Pharm.**, 117, 55-62. 10

Stradford TR. Kelley A. (1997) **J Neurosci.**, 17, 4434-10 4440.

Stradford TR. Kelley A. (1999) **J Neurosci.**, 19, 11040-8.

Stradford TR. Swanwon CJ. Kelley A. (1998) **Behav Brain Res.**, 93, 43-50.

15 Taber MT. Fibiger HC. (1997) **Neuroscience**, 76, 1105-112. 20

Ulmer C. Engels P. Abdel'Al A. Lubbert H. (1996) **Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.**, 354, 210-212.

Vergoni AV. & Bertolini A. (2000) **Eur J Pharmacol.**, 20 405 (1-3), 25-32.

Vickers SP. Dourish CT. Kennett GA. (2001) **Neuropharmacology**, 2, 200-9.

Visselman JO. Roig M. (1985) **J Clin Psychiatry**, 46, 118-24. 30

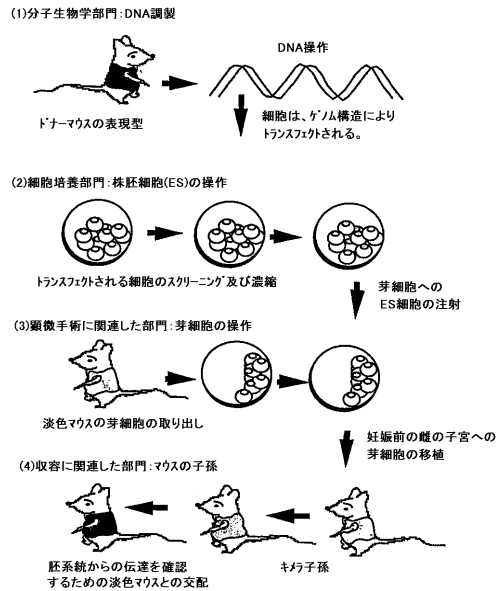
25 Vilaro MT. Cortès R. Gerald C. Branchek TA. Palacios JM. Mengod G. (1996) **Mol Brain Res.**, 43, 356-360.

Waeber C. Sebben M. Nieoullon A. Bockaert J. Dumuis A. (1994) **Neuropharmacology**, 33, 527-541.

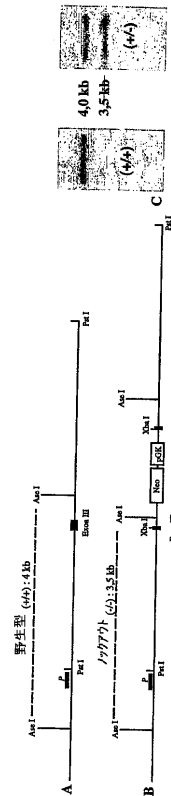
30 Yamada J. Sugimoto Y. Ujikawa M. (1999) **Eur J Pharmacol.**, 383, 49-51.

Zahorodna A, Tokarski K, Bijak M. (2000) **Pol J Pharmacol.**, 52(2), 107-9. 40

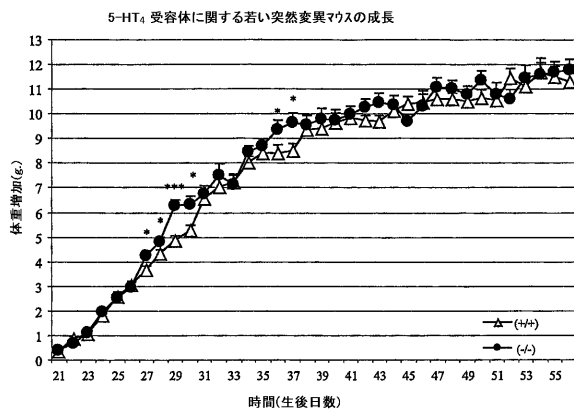
【図 1】



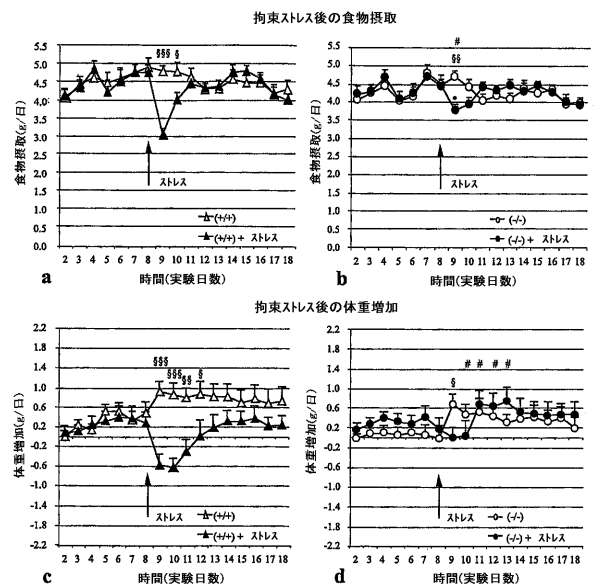
【図 2】



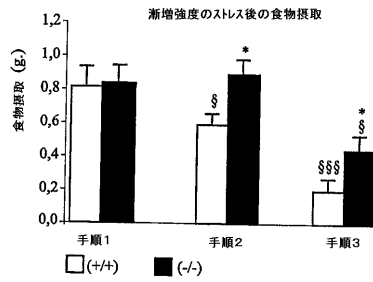
【図 3】



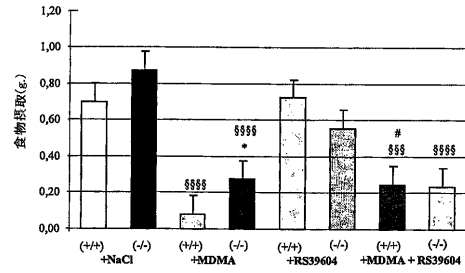
【図 4】



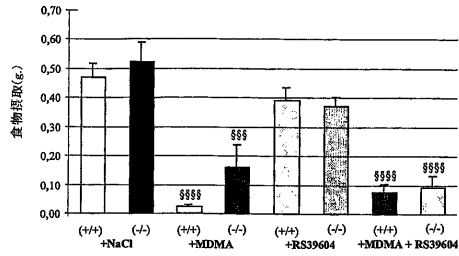
【図5】



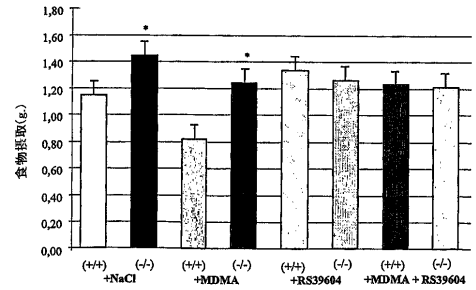
【図6B】



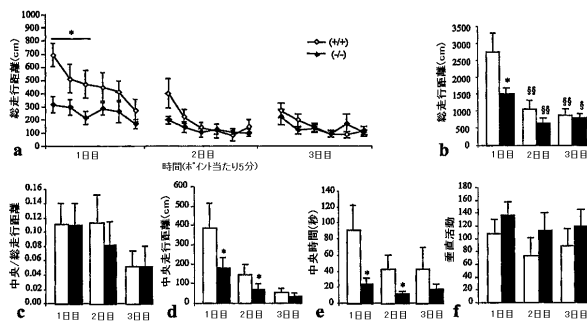
【図6A】



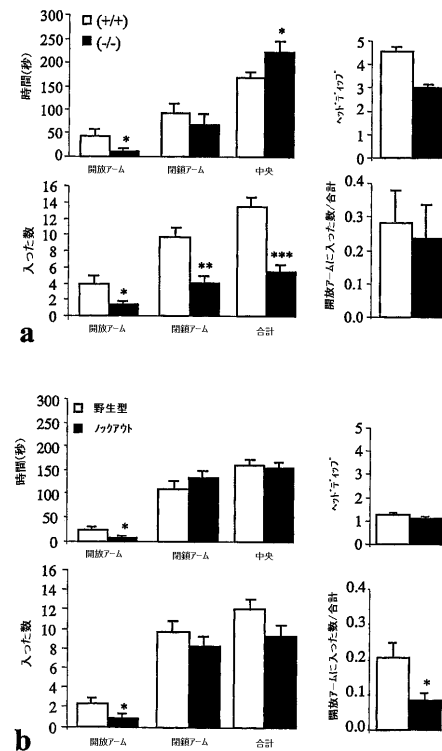
【図6C】



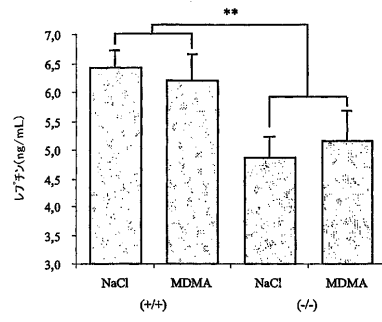
【図7】



【図8】



【図 9】



フロントページの続き

(72)発明者 コンパン ヴアレリエ

フランス、セダー 05 モンペリエ、エフ - 3 4 0 9 4、ナンバー 2 1 9、エタージ 1、パティ
メント ビー、リュ ミシェル テユーレ、レジデンス レ ジュー ド 1 7 0

審査官 小森 潔

(56)参考文献 Journal of Pharmacology and Experimental Th
erapeutics, 1999年, Vol. 291, No. 1, p300 - 307

Journal of Biological Chemistry, 2001年, Vol. 2
76, No. 48, p44881 - 44888

British Journal of Pharmacology, 2000年, Vol. 1
31, No. 4, p827 - 835

British Journal of Pharmacology, 2000年, Vol. 1
29, No. 4, p771 - 781

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/435

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)