

高親和性コリン取り込み促進薬 MKC-231 の
コリン作動性神経活性調節メカニズムに関する研究

高科 謙

目次

| | |
|--|----|
| 略号 | 5 |
| 第1章 序論 | 6 |
| 第2章 ACh 合成と ACh 放出に対する作用の検討..... | 9 |
| 2.1 緒言 | 9 |
| 2.2 材料および方法..... | 11 |
| 2.2.1 動物..... | 11 |
| 2.2.2 試薬..... | 11 |
| 2.2.3 AF64A の調整方法 | 11 |
| 2.2.4 手術..... | 12 |
| 2.2.5 海馬シナプトソームを用いた作用の検討 | 13 |
| 2.2.6 ラット海馬スライスを用いた作用の検討 | 16 |
| 2.2.7 In vivo マイクロダイアリシスを用いた作用の検討..... | 18 |

| | | |
|-------|-----------------------------------|----|
| 2.2.8 | データ解析 | 19 |
| 2.3 | 結果 | 21 |
| 2.3.1 | 海馬シナプトソームを用いた作用の検討 | 21 |
| 2.3.2 | 海馬スライスを用いた作用の検討 | 26 |
| 2.3.3 | In vivo マイクロダイアリシスを用いた作用の検討 | 29 |
| 2.4 | 考察 | 31 |
| 2.5 | 要約 | 35 |
| 第3章 | HACU 促進作用のメカニズムの解析 | 36 |
| 3.1 | 緒言 | 36 |
| 3.2 | 材料および方法 | 37 |
| 3.2.1 | 動物 | 37 |
| 3.2.2 | 試薬 | 37 |
| 3.2.3 | AF64A の調整方法 | 38 |
| 3.2.4 | 手術 | 38 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.2.5 | M-MKC-231 の HACU への作用の検討 | 39 |
| 3.2.6 | [³ H]-HC-3 結合試験による検討 | 40 |
| 3.2.7 | CHT1 発現 COS7 細胞の調製 | 41 |
| 3.2.8 | CHT1 発現細胞膜における [³ H]-MKC-231 結合試験..... | 43 |
| 3.2.9 | Biacore 法を用いた結合親和性試験 | 43 |
| 3.2.10 | データ解析 | 45 |
| 3.3 | 結果 | 46 |
| 3.3.1 | HACU の測定 | 46 |
| 3.3.2 | [³ H]-HC-3 結合試験による検討 | 46 |
| 3.3.3 | [³ H]-MKC-231 結合試験 | 48 |
| 3.3.4 | Biacore 法を用いた結合親和性試験 | 50 |
| 3.4 | 考察 | 53 |
| 3.5 | 要約 | 59 |
| 第4章 | 結論 | 60 |

| | |
|------------|----|
| 引用文献 | 61 |
| 謝辞 | 70 |

略号

| | |
|--------------------------------|------|
| Alzheimer's disease | AD |
| acetylcholine | ACh |
| artificial cerebrospinal fluid | ACSF |
| choline | Ch |
| choline esterase | ChE |
| high-affinity choline uptake | HACU |
| hemicholinium-3 | HC-3 |
| radioimmunoassay | RIA |
| surface plasmon resonance | SPR |

第 1 章 序論

認知症は、現代の高齢化社会において深刻度を増している医学的・社会的問題であり、2013 年度の厚生労働省研究班調査によると、全国の認知症有病者数は約 439 万人（平成 22 年）と推計されている。認知症の原因となる主な疾患には、アルツハイマー病、脳血管性認知症、レビー小体型認知症があるが、その中でも最も頻度が高いものはアルツハイマー病であるとされ、認知症全体の 40～60%を占めている。アルツハイマー病の主な病理学的特徴は、神経細胞内神経原線維変化、アミロイド斑の病理像の形成と、コリン作動性神経の神経変性とその後のセロトニン作動性神経及びノルアドレナリン作動性神経の変性である。アセチルコリン（ACh）を神経伝達物質とするコリン作動性神経は、中枢及び末梢神経系において重要な機能を果たし、特に、中枢神経系においては注意、記憶、覚醒などの認知機能における中核的な機能を担っていることから、コリン作動性神経の変性はアルツハイマー病の初期臨床症状（短期記憶喪失、見当識喪失、判断力欠如）の発現に深く関与すると考えられ（Kasa, Rakonczay, & Gulya, 1997; Schliebs & Arendt, 2006; Terry & Buccafusco, 2003）、臨床的には、アセチルコリンの分解酵素（ChE）阻害薬など、コリン作動性神経機能を改善する物質がアルツハイマー病患者の認知機能低下の緩和に用いられている。ChE 阻害薬は、ACh の分解を抑えることで、シナプスにおける ACh 濃度を高める働きをする。AD 患者において、ChE 阻

害薬は、臨床的意味のある改善作用を示すが、その効果は限定的であり、消化器症状を主とする副作用の発現が、長い治療期間において服薬コンプライアンスの低下につながっている (Terry & Buccafusco, 2003). 従って、AD 患者の治療に、より有効で、服薬しやすい薬物治療法の開発が求められている.

MKC-231 (INN: coluracetam, CAS:135463-81-9) は、アルツハイマー病治療薬として創製されたコリン作動性神経賦活薬である. ChE 阻害薬のようにシナプス間隙で ACh の分解を抑制するのではなく、神経終末において ACh 合成の律速段階であるトランスポーターを介した高親和性コリン取り込み (HACU: High-affinity choline uptake) を促進し、ACh 合成能を高めることで、神経伝達時における神経終末から放出される ACh 量を増大させることを目指した薬剤である. コリン作動性神経への傷害作用のある神経毒 AF64A を脳室内処置したラットから調製した海馬シナプトソームを用いて HACU 促進作用を指標にしたスクリーニングにより見出された. AF64A は、コリン作動性神経に比較的選択性の高い神経毒であり、脳室内投与により長期間にわたって海馬の HACU 及び ACh 放出を障害することが報告されており (Fisher, Mantione, Abraham, & Hanin, 1982)、コリン作動性神経系の機能低下という AD のある側面を反映したモデルとして考えられている (Hortnagl, 1994; Jarrard, Kant, Meyerhoff, & Levy, 1984). MKC-231 については、これまでに、種々の学習記憶障害モデル動物 (AF64A 処置モデル動物 (ラット、マウス)、老齢ラット、前脳基底部破壊ラットなど) で

行動障害ならびにコリン作動性神経の神経化学的な指標（HACU, 組織中 ACh 含量など）の改善が報告されている（Bessho et al., 1996; Murai et al., 1994). しかし、その改善作用の詳細な機序については、HACU の調節機構そのものに未解明な部分が多く、明確な説明はなされて来なかった. この作用機序を解明をすることは、MKC-231 の臨床応用上の意義を考える上で重要であるばかりでなく、HACU を介したコリン作動性神経の活性調節が如何に行われているかを解明する上でも重要であると考えられた. そこで、本研究では、MKC-231 の ACh 神経の賦活作用の詳細について検討するとともに、その作用機序を解明を目指した.

第2章 ACh 合成と ACh 放出に対する作用の検討

2.1 緒言

本章においては、AF64A 処置ラットにおいて低下した ACh 合成及び ACh 放出能に与える MKC-231 の影響を、海馬シナプトソーム、海馬スライス、in vivo でのラット海馬を用いて検討を行った。検討に当たっては、対照薬として ChE 阻害薬の tacrine を用い、その薬理学的な作用の相違についても検討した。

初めに、海馬シナプトソームを用い、Ch の取り込みと、それに引き続く ACh の放出に対する MKC-231 の作用を検討し、HACU の促進がシナプスにおける ACh 新規合成、ACh 放出に与える影響について明らかにした。次に、AF64A 処置ラットの海馬スライスを用いた検討で、脱分極刺激が繰り返されることで ACh 放出が低下することが報告されていることから (Leventer, McKeag, Clancy, Wulfert, & Hanin, 1985; Potter & Nitta, 1993)、海馬スライスを繰り返し高濃度 K^+ 脱分極刺激 (high- K^+ 刺激) を負荷できる実験系を考案し、灌流液に回収される ACh 量の低下に対する MKC-231 の影響を明らかにした。最後に、in vivo の海馬 ACh 濃度に対する MKC-231 の作用を検討するため、覚醒下、非拘束、生理的条件下にて in vivo マイクロダイアリシスを行い、海馬の基底状態の ACh 濃度に対する MKC-231 投与による影響を検討した。この際、ACh の定量には、高感度での測定が可能であるラジオイムノアッセイ (RIA) 法

(Kawashima et al., 1994) にて行った.

2.2 材料および方法

2.2.1 動物

実験には Wistar 系雄性ラット（日本医科学動物資材研究所(株)）を用いた。ラットは 12 時間ごとの明暗サイクルの条件下で、餌と水は自由に摂取させた。動物実験は、田辺三菱製薬動物実験委員会の定める倫理指針に従って実施された。

2.2.2 試薬

N-(2,3-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydro-furo[2,3-b]quinolin-4-yl)-2-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)acetamide (MKC-231) 及び ethylcholine mustard aziridinium-picrate (AF64A 前駆物質) は田辺三菱製薬(株)（大阪）にて合成されたものを用いた。[³H]-Ch 及び Permafluor scintillation cocktail は、PerkinElmer (Wellesley, MA, U.S.A.) より、[³H]-ACh は Amersham Life Science (Buckinghamshire, U.K.) より、 γ -globulin は Miles Inc. (Kankakee, IL, U.S.A) より購入した。その他の試薬についても、市販品を購入して用いた。

2.2.3 AF64A の調整方法

AF64A は Fisher らの方法 (Fisher et al., 1982) に従い、その前駆物質である

ethylcholine mustard mustard aziridinium-picrate より使用時ごとに調製した。具体的には、最終濃度に合わせて ethylcholine mustard mustard aziridinium-picrate の必要量を生理的食塩水にて溶解し、その溶液を NaHCO_3 を用いて pH 7.4 に合わせ、1 時間室温にて静置反応させたのち、再度 NaHCO_3 を用いて pH 7.4 に合わせることで調製した。調製した薬物は、手術において使用するまで氷温にて保冷した。

2.2.4 手術

AF64A 処置動物の作製は別所らの方法 (Bessho et al., 1996) に従った。Wistar 系雄性ラット (180 g-200 g) をペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) にて脳定位固定装置 (SM-15, 成茂) に固定した。ラット頭皮を切開して頭蓋骨を露出させ、Paxinos and Watson の脳図譜 (1986) に従って側脳室にインジェクションカニューレの先端が届くよう、bregma より尾側に 1.0 mm、外側に 1.4 mm に歯科用ドリルにて小骨窓を開け、その骨表より腹側に 3.6 mm の位置にインジェクションカニューレの先端をセットして、両側性に AF64A (3 nmol/ 3 μl per brain) を投与した。投与は、流速 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ でマイクロインジェクションポンプ (CMA/100, Carnegie Medicine AB) にて行い、投与終了後 3 分間、インジェクションカニューレを静置した後、ゆっくりと引き抜いた。小骨窓は歯科用セメントで埋め、頭皮を縫合し、感染症の防止のためペニシリン 20,000 単位を皮下注射にて投与した。この方法で用いた AF64A の投与量は、他の神経系への

毒性の影響が小さいということが報告されている用量である (Chrobak, Hanin, Schmechel, & Walsh, 1988; Gower et al., 1989). ラットは 10 日間程度の回復期間を置いたのち、実験に供した. In vivo マイクロダイアリシスの実験では、さらに海馬にマイクロダイアリシスプローブを埋め込む手術を行った. 方法は Kawashima らの方法に準じた (Kawashima et al., 1994). 具体的には、ラットを脳定位固定装置 (SM-15/S, 成茂) に固定して骨表を露出し、CMA/12 マイクロダイアリシスプローブ (膜長 3.0 mm, 外形 0.5 mm, Carnegie Medicine AB) を左側海馬に対して垂直より 10 度の傾きで刺入させ、プローブの先端の座標が、bregma より尾側に 5.2 mm、外側に 4.0 mm、腹側に 8.0 mm の位置になるように固定した. このプローブを、骨表に打ったアンカー用のスクリューねじとともに、歯科用セメントにて固定した. 手術後 2 日間、個別ケージにて回復期間を置いたのち、実験に供した.

2.2.5 海馬シナプトソームを用いた作用の検討

ラットを断頭後、脳を速やかに摘出して、氷冷したステージ上にて海馬を切り出した. 切り出した海馬は、速やかに氷冷した 10 倍容の 0.32 M sucrose 溶液でガラス-テフロンホモジナイザーによってホモジナイズし、冷却遠心分離 (4 °C, 1000 X g, 10 分間) の後上清をとり、さらに冷却遠心分離 (4 °C, 20,000 X g, 15 分間) した. 得られた沈渣 (P2 フラクション) を 1 匹の両側海馬あたり 4.2 ml の 20 mM Tris-phosphate buffer (組

成 (mM): NaCl, 118.5; KCl, 4.5; MgCl₂, 1.2; CaCl₂, 1.27; dextrose, 10.0, pH 7.4)にて再懸濁し、海馬シナプトソームとして用いた。

海馬シナプトソーム 0.2 ml を 1.6 ml の被験薬又は溶媒を加えた 20 mM Tris-phosphate buffer に加え 37 °C にて 30 分間、プレインキュベーションした。その直後に 0.2 ml の [³H]-Ch 溶液 (5 Ci/mmol, 1 μM) を加え、さらに 10 分間のインキュベーションを行い、シナプトソームへ [³H]-Ch の取り込みを行わせた。 [³H]-Ch の取り込みは氷冷により停止し、冷却遠心分離 (4 °C, 20,000 X g, 5 min) にてシナプトソームを沈渣に回収した。沈渣を 0.5 μM の eserine を含む 20 mM Tris-phosphate buffer にて 2 回洗浄し、蛋白濃度が 0.4 mg/ml になるように再懸濁した。HACU は、 [³H]-Ch を取り込ませた海馬シナプトソーム 100 μl を ACS-2 シンチレーションカクテルに直接溶解して得られた放射能の測定値から、非特異的取り込み (低親和性取り込みを含む) として、20 mM Tris-phosphate buffer の組成で NaCl を sucrose (237 mM) に置き換えた Na-free buffer を用い、10 μM hemicholinium-3 (HC-3) 存在下での [³H]-Ch 取り込みを行わせた海馬シナプトソームでの放射能の測定値を引くことから算出した。

ACh 放出の実験では、 [³H]-Ch を取り込ませた海馬シナプトソーム 100 μl を、eserine 0.5 μM を含有させた 900 μl の 20 mM Tris-phosphate buffer に加え 5 分間 37 °C でインキュベーションを行った。このとき、20 mM Tris-phosphate buffer はカリウムイオン濃度について、正常 (4.5 mM) と高カリウムイオン (high-K⁺) 刺激用

(35 mM) を用いた. High- K^+ 刺激用のバッファの組成 (mM) は以下の通りに調製した; NaCl, 88.0; KCl, 35; $MgCl_2$, 1.2; $CaCl_2$, 1.27; dextrose, 10.0; Tris- PO_4 , 20, pH 7.4.

インキュベーション終了後、直ちにアッセイチューブを冷却遠心分離 (4 °C, 20,000 X g, 5 min) し、上清 200 μ l に対して 50 μ l の 50 mM Glycylglycine buffer (12.5 mM $MgCl_2$, 10 mM ATP, 0.01 unit/ml choline kinase 含有, pH 8.5) を加えて 37 °C にて 15 分間のインキュベーションを行って、Ch を phosphocholin とした. 反応終了後、tetraphenylborate sodium salt (10 mg/ml) を含有した 300 μ l の butyronitrile 及び 500 μ l シンチレーションカクテル (3.8 %の Permafluor scintillation cocktail のトルエン溶液) を加え、激しく混和した後、冷却遠心分離 (4 °C, 15,000 X g, 2 分間) にて、トルエン層と水層を分離し、トルエン層に回収された [3H]-ACh の放射能をシンチレーションカウンターにて測定した. サンプルの蛋白量は、DC Protein Assay reagents (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いた方法で測定した. MKC-231 は、dimethylsulfoxide (DMSO) にて、DMSO 終濃度が 0.01 μ M になるように目的とする濃度に溶解し、assay buffer で希釈調製して用いた. 本実験では、MKC-231 は、前処理又は high- K^+ 刺激のタイミングでアッセイバッファに溶解して処置した.

[3H]-ACh 放出に対する MKC-231 の作用は二つのプロトコルで検討され、最初のプロトコルでは MKC-231 は [3H]-Ch 取り込みの前処置と取り込み時にシナプトソームに作用させ、二つ目のプロトコルでは high- K^+ 刺激時のみにシナプトソームに作用

させた。後者のプロトコールでは、シナプトソームへの $[^3\text{H}]\text{-Ch}$ 取り込みの条件を被験薬物濃度間で揃える必要があったので、 $[^3\text{H}]\text{-Ch}$ 取り込みをセットごとにまとめて行った。

2.2.6 ラット海馬スライスを用いた作用の検討

ラットを断頭後、脳を速やかに摘出して、氷冷したステージ上にて海馬を切り出した。これを、McIlwain tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshall, U.K.) にて、厚さ 300 μm のスライスを調製した。海馬スライスの湿重量を測定したのち、スライスは O_2/CO_2 (95 %/5 %) の混合ガスを通気させた人工脳脊髄液 (ACSF, 組成 (mM): NaCl 139, KCl 3.4, NaH_2PO_4 0.6, NaHCO_3 21.0, CaCl_2 1.26, MgCl_2 1.15, glucose 10) にて 37 $^\circ\text{C}$ 、30 分間のインキュベーションを行った。次に、スライスを非可逆的 ChE 阻害薬である paraoxson を 10 μM 含む ACSF に移して、37 $^\circ\text{C}$ 、30 分間インキュベーションを行い、内在性の ChE 活性を消失させた。反応終了は、スライスの遠心分離操作により行い、反応液を反応チューブから除いた後、ACSF で 2 回、洗浄を行った。1 セットの実験を行うにあたって、およそ 100 mg の海馬スライスを、マイクロチューブポンプ (東京理科機械) にシリコンチューブ (内径 1.5 mm) でつながった容量 1 ml の灌流チャンバーにセットした。灌流液は、チャンバーの上部から下部に向かって流れるように接続され、流速は 0.2 ml/min とした。灌流液及び灌

流チャンバーは、実験を通して 37 °C に保った。また、灌流液には choline (10 μ M) を添加した。High- K^+ 刺激は、灌流液を通常の ACSF から high- K^+ 刺激用 ACSF (組成: 112.4 mM NaCl, 30.0 mM KCl, 0.6 mM NaH_2PO_4 , 21.0 mM NaHCO_3 , 1.26 mM CaCl_2 , 1.15 mM MgCl_2 and 10 mM glucose) に交替させることでスライスに負荷した。20 分間の平衡化のための灌流を行った後、海馬スライスを normal- K^+ 及び high- K^+ -ACSF で交互に灌流した。AF64A 処置ラットより調製した海馬スライスを ACSF で灌流し、灌流液を 8 分毎に回収した。High- K^+ 刺激用 ACSF に灌流液を交換したフラクションから続いて 3 フラクションの灌流液の ACh 含量を、high- K^+ 刺激により誘発された ACh 放出を反映するものとして測定した。最初の high- K^+ 刺激のセッションで測定された ACh 含量を S0 として測定し、次に薬物又は溶媒を灌流液に添加し high- K^+ 刺激を連続負荷して回収されたサンプルを S1-S4 として、灌流液に回収された ACh 量を S1 から S4 の S0 に対する割合として算出した。ACh の測定は、灌流液を 0.45 μ m disk filter (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) にて濾過後、EicomPak AC column (AC-GEL, エイコム) と、酵素カラム (AC-Enzymepak, エイコム) を用いた HPLC-ECD システムによって測定した。移動相には 0.89 mM 1-decanesulfonic acid sodium salt と 0.59 mM tetramethylammonium chloride を含有する 0.1 M phosphate buffer (pH 8.5) を用い、流速は 1 ml/min とした。酵素カラムの通過時に、ACh がカラム内に固定された ChE 及び choline oxidase による反応を受け産生される

過酸化水素を白金電極（電位を+450mV にセット）により検出した．内標物質として Ethylhomocholine を用いた．

2.2.7 In vivo マイクロダイアリシスを用いた作用の検討

ラット脳にマイクロダイアリシスプローブを埋め込んで 3 日後に、ラットを 2-channel swivel (エイコム) につなぎ、Ringer's solution (組成(mM) : NaCl 147, KCl 4.0, CaCl₂ 2.3) をダイアリシス用シリンジポンプ (エイコム) を用いて 2 μ L/min の流速で灌流した．マイクロチューブ接続後、1 時間の予備的な灌流を行った後、灌流液を 30 分ごと、フラクションコレクターにセットしたサンプルチューブに 4 °C の条件で回収した．回収された ACh が分解されることを抑えるためチューブにはあらかじめ 35 μ l の 0.01 N 酢酸を添加した．被験薬の投与は経口にて行い、MKC-231 の溶媒には 0.5 % Tween 80 を用いた．tacrine は蒸留水に溶解して用いた．

回収した灌流液サンプル中に含まれる ACh の総量の測定は、Kawashima らの方法 (Kawashima et al., 1994) に従い Radio Immuno Assay (RIA) にて行った．RIA には、choline hemiglutarate-bovine serum albumin conjugates を抗原に取られたウサギの抗血清と、[³H]-ACh (2.85 TBq/mmol) を用いた．この RIA は ACh の検出特異性が高く Ch, phosphatidylcholine, phosphorylcholine に対する交差性はいずれも 0.012 % 以下であり、また ACh の測定感度も 3 pg/tube (約 20 fmol/tube) までであることが川島

らによって報告されている. 30 分間の各フラクションで集められた灌流液に、100 μ l の 0.15M Tris-HCl buffer に希釈された [3 H]-ACh chloride 溶液 (約 7000 dpm)、100 μ l の 0.4 % γ -globulin に希釈された抗血清 (1:1200)、100 μ l の 0.15 M Tris-HCl buffer, pH 7.4) を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた. 翌日、硫酸法による塩析を行い、抗体に結合した [3 H]-ACh を分離し、[3 H]-ACh 量を液体シンチレーションカウンターによる放射能測定より算出した. 測定時のブランクとして、灌流サンプルと同量の灌流液を用いた. 各ラットの各時点での ACh 量は、薬物を投与した時点 (time 0) に対する 割合として % で表示した.

2.2.8 データ解析

統計的解析については、海馬シナプトソームを用いた実験では、HACU 及び ACh 放出について分散分析を two-way ANOVA (sample X dose) で行い有意であった場合に Dunnett's multiple comparison test (vehicle vs. drug treated groups) にて有意差を検討した. 海馬スライスを用いた実験では、薬物処置後の ACh 量について分散分析を行い有意であった場合に Dunnett's two-tailed test にて有意差を検討した. In vivo マイクロダイアリシスの実験ではデータを薬物投与直前のタイミング (time 0) での ACh 量の値を 100 %とした標準化を行い、薬物投与による ACh 量に対する影響について分散分析を行い有意であった場合に Dunnett's test を実施した. いずれの検定におい

ても、有意水準は $P<0.05$ とした.

2.3 結果

2.3.1 海馬シナプトソームを用いた作用の検討

AF64A 処置ラットの海馬 HACU は正常動物に比較して低下が確認された。AF64A 処置ラットより調製した海馬シナプトソームに、被験薬を前処置及び $[^3\text{H}]\text{-Ch}$ 取り込み時において作用させた結果、MKC-231 (10^{-8} and 10^{-7} M) は海馬 HACU を有意に増加させた (Fig. 1a)。Tacrine (10^{-9} - 10^{-7} M) には HACU に対する作用は見られなかった (Fig. 1c)。正常動物より調製した海馬シナプトソームにおいては、MKC-231 も tacrine も HACU に対する作用は見られなかった (Fig. 1b, d)。これらのシナプトソームを用いた normal K^+ (4.5 mM) 及び high- K^+ 刺激 (35 mM) 時の $[^3\text{H}]\text{-ACh}$ 放出量は、AF64A 処置により低下が観察され、その低下は high- K^+ 刺激時において顕著であった。MKC-231 (10^{-9} - 10^{-7} M) は、normal K^+ での $[^3\text{H}]\text{-ACh}$ 放出には影響を与えなかったが (Fig. 2a, left)、 10^{-8} 及び 10^{-7} M において high- K^+ 刺激時の $[^3\text{H}]\text{-ACh}$ 放出を有意に増加させた (Fig. 2a, right)。Tacrine は、normal K^+ (4.5 mM) 及び high- K^+ 刺激 (35 mM) のいずれにおいても $[^3\text{H}]\text{-ACh}$ 放出に対する有意な作用は見られなかった (Fig. 2b, d)。海馬シナプトソームに対して被験薬を $[^3\text{H}]\text{-ACh}$ 放出の刺激時にのみ作用させた場合には、MKC-231 (10^{-9} - 10^{-7} M) も tacrine (10^{-9} - 10^{-7} M) も、正常及び AF64A 処置ラットいずれから調製した海馬シナプトソームの $[^3\text{H}]\text{-ACh}$ 放出に対しても有意な作用は

見られなかった (Fig. 3 a-d).

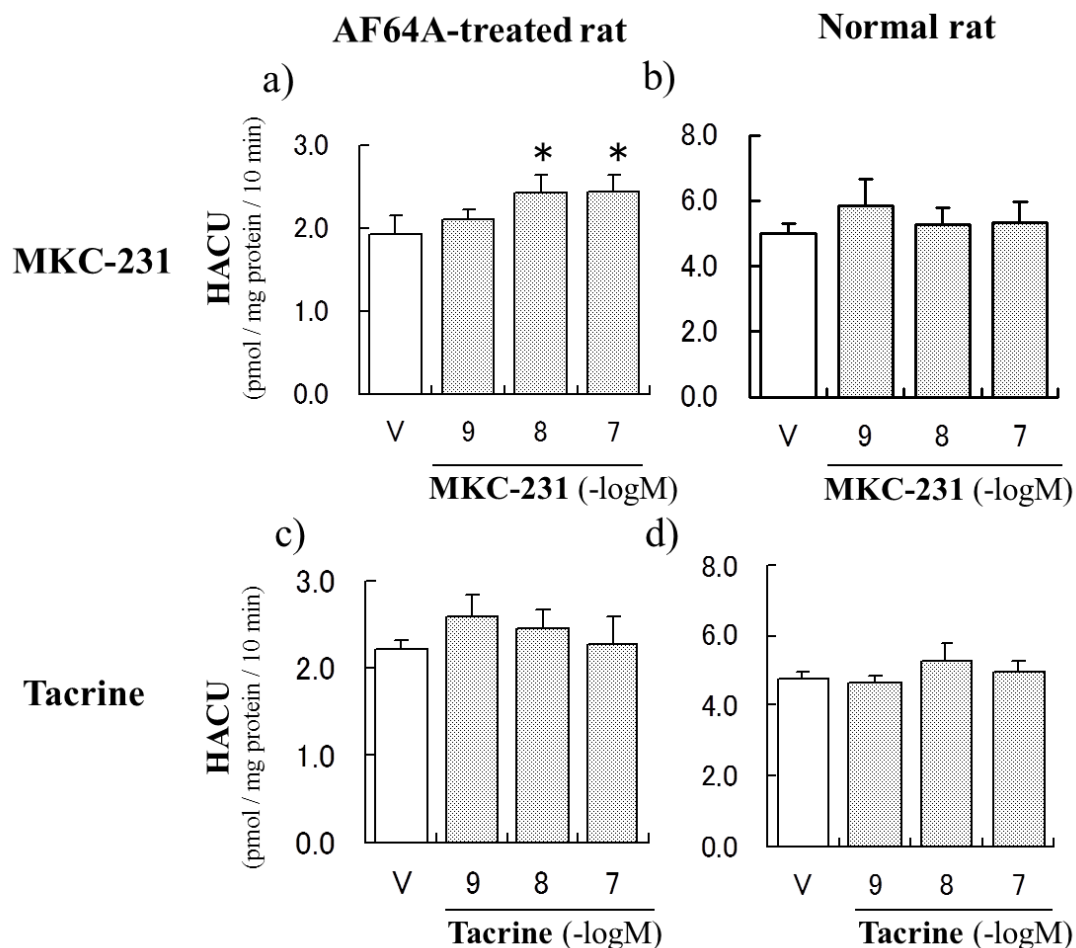


Fig.1 Effect of MKC-231 on HACU in hippocampal synaptosomes of normal and AF64A-treated rats. Hippocampal synaptosomes were incubated in the absence (vehicle) or presence of the drugs (varying concentrations from 10^{-9} M to 10^{-7} M) during the pretreatment period (30 min at 37 °C) and [3 H]-choline uptake period (10 min at 37 °C). HACU was calculated by subtracting the uptake counted in the sodium-free buffer with 10 μ M HC-3 from total uptake. Values are shown as mean \pm S.E.M. (n=9). *; $p < 0.05$, vs vehicle (Dunnett's test)

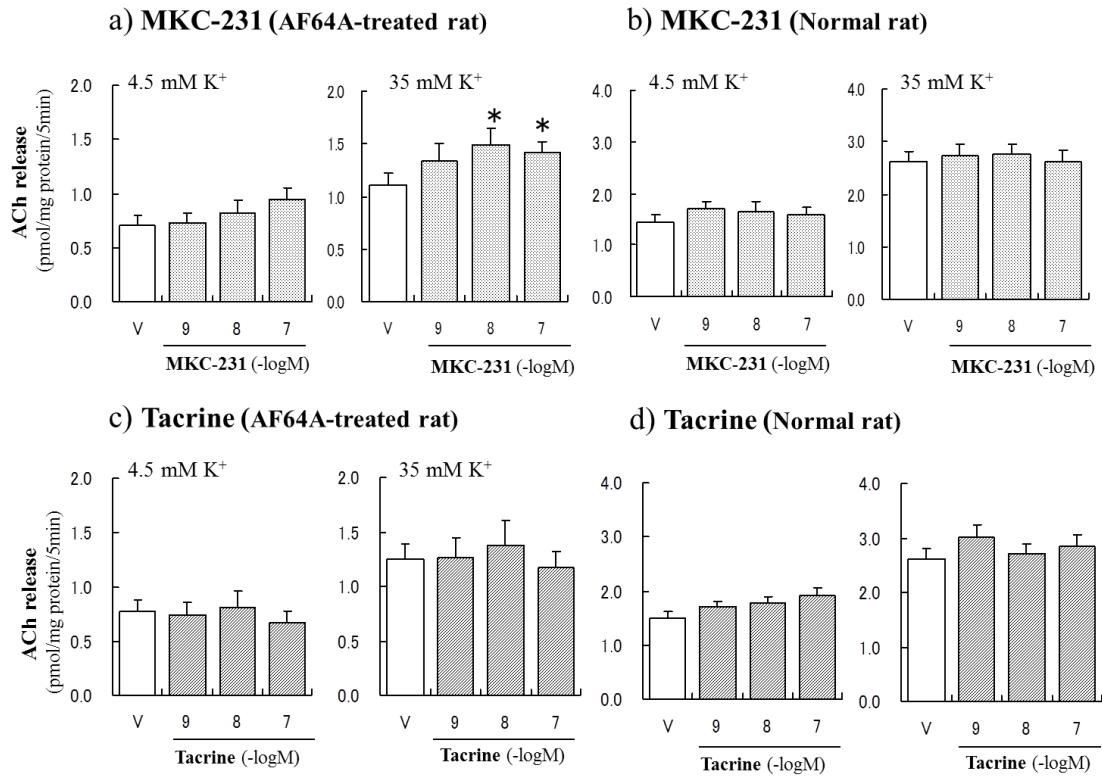


Fig.2 Effect of MKC-231 and tacrine on ACh release in hippocampal synaptosomes of normal and AF64A-treated rats. Hippocampal synaptosomes were incubated in the absence (vehicle) or presence of the drugs (varying concentrations from 10^{-9} M to 10^{-7} M) during the pretreatment period (30 min at 37 °C) and [3 H]-choline uptake period (10 min at 37 °C). Basal release (4.5 mM of [K⁺]) and high-K⁺ (35 mM of [K⁺]) induced [3 H]-ACh release was measured. Values are shown as mean±S.E.M. (n=9). *; $p < 0.05$, vs vehicle (Dunnett's test)

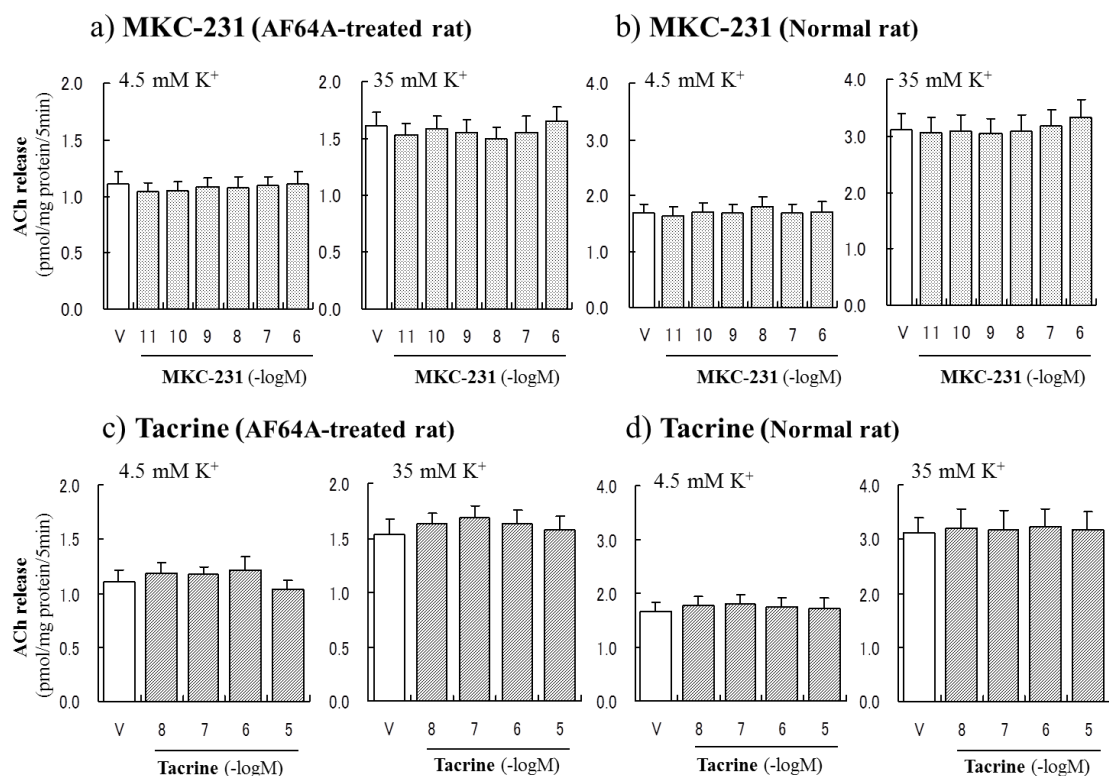


Fig.3 Effect of MKC-231 and tacrine on ACh release in hippocampal synaptosomes of normal and AF64A-treated rats. Hippocampal synaptosomes were incubated in the absence of the drugs during the pretreatment period (30 min at 37 °C) and [³H]-choline uptake period (10 min at 37 °C) after which basal (4.5mM of [K⁺]) and high-K⁺ (35 mM of [K⁺]) induced [³H]-ACh release was measured in the absence (Vehicle) or presence of MKC-231 (varying concentrations from 10⁻¹¹M to 10⁻⁶M). Values are shown as mean±S.E.M. (n=8).

2.3.2 海馬スライスを用いた作用の検討

AF64A 処置ラットより調製した海馬スライスにおいて、high- K^+ 刺激による ACh 放出は、繰り返し刺激 (Fig. 4a) の回数に従って低下した。この低下に対して、灌流液中に MKC-231 (10^{-8} 及び 10^{-7} M) を添加し作用させることで Vehicle に対して有意な改善作用が見られた (Fig. 4b)。S1 から S4 において回収された ACh 量の平均値において比較した場合においても、MKC-231 (10^{-8} 及び 10^{-7} M) は Vehicle に対して有意な改善作用を示した (Fig. 5a)。一方、tacrine (10^{-9} - 10^{-7} M) には、この ACh 量の低下において Vehicle に対して有意な作用は見られず (Fig. 4c)、S1 から S4 において回収された ACh 量の平均値においても同様に有意な作用は見られなかった (Fig. 5b)。

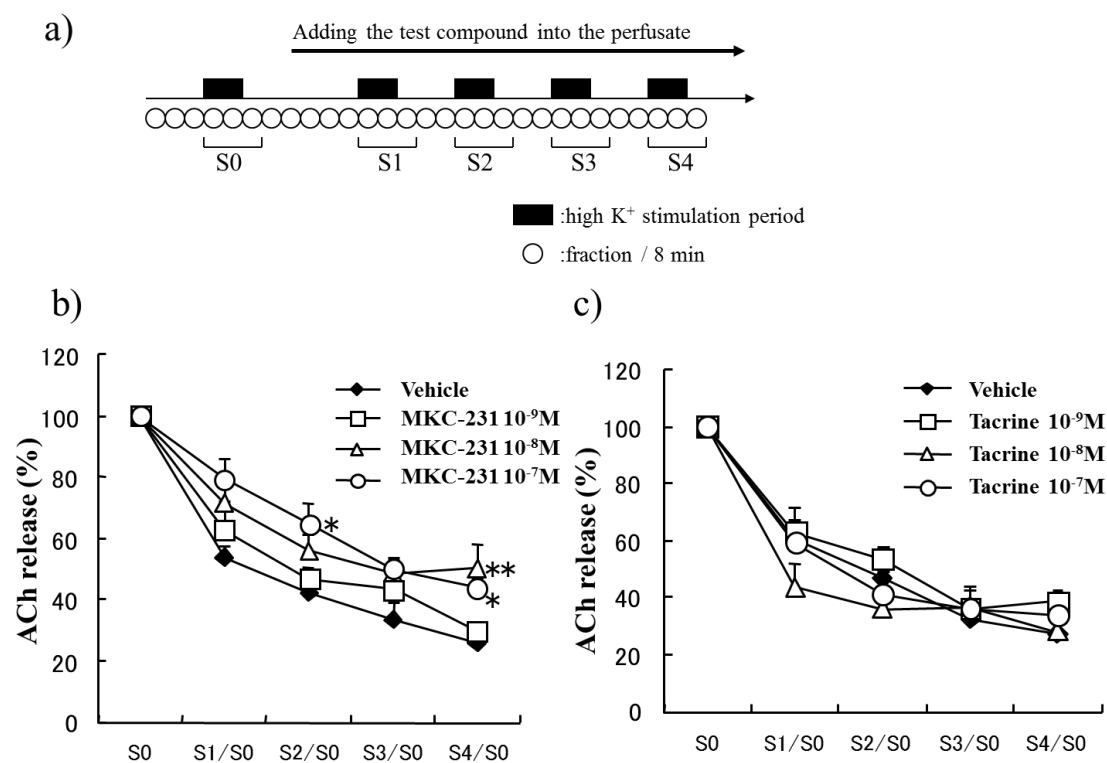


Fig.4 Effect of MKC-231 and tacrine on ACh release in hippocampal slices of AF64A-treated rats. Fig.4a shows resting and stimulating procedure with alternating normal and high-K⁺ ACSF. The perfusate was collected every 8 min (0.2 ml/min) and the content of ACh in the perfusate of the successive three fractions after applying high K⁺ stimulations measured and summed as S0 to S4. The addition of drugs to the perfusate was started 24 min before the S1 fraction. ACh release induced by the high-K⁺ stimulation was expressed as a % of S0 in S1 to S4 under incubation with MKC-231 (Fig. 4b) or tacrine (Fig. 4c). Values are shown as mean±S.E.M. (n=9 in MKC-231, n=8 in tacrine). *: p<0.05, **: p<0.01 vs vehicle (Dunnett's two-tailed test)

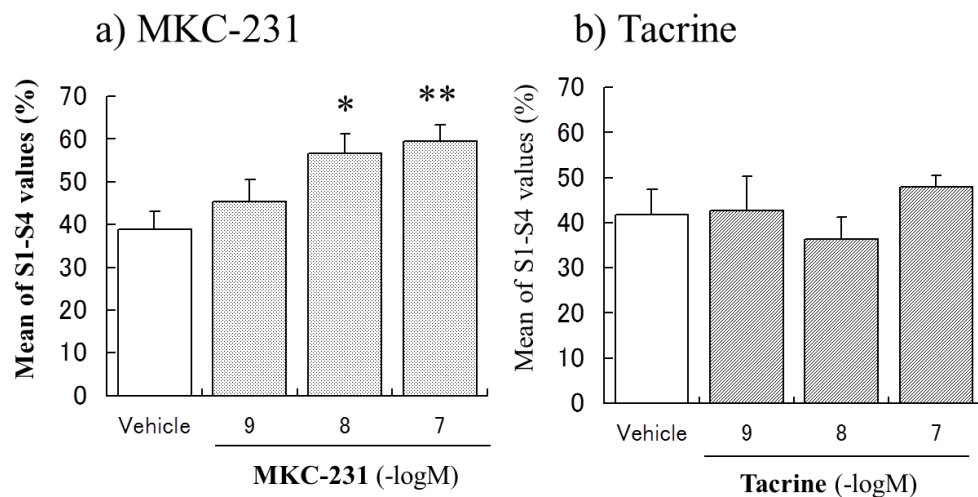


Fig.5 Effect of MKC-231 and tacrine on ACh release in hippocampal slices of AF64A-treated rats. ACh release induced by high K^+ stimulation was expressed as the mean of S1 to S4 under incubation with MKC-231 (Fig. 5a) or tacrine (Fig. 5b). Values are shown as mean \pm S.E.M. (n=9 in MKC-231, n=8 in tacrine). *; $p<0.05$, **; $p<0.01$ vs vehicle (Dunnett's two-tailed test)

2.3.3 In vivo マイクロダイアリスを用いた作用の検討

AF64A 処置ラットの基底状態に灌流液に回収された ACh 量は、time 0 hr において Vehicle 群で 62.9 ± 17.0 fmol /30 min (MKC-231 投与試験, Fig. 6a) 及び 71.6 ± 13.3 fmol/30 min (tacrine 投与試験, Fig. 6b) であった. MKC-231 (1 - 10 mg/kg, p.o.) の投与により、灌流液に回収された ACh 量は増加し、10 mg/kg, p.o. においては被験薬投与後の最初のフラクションにおいて基底状態の 263 %に達し、その作用は有意であった. さらに、MKC-231 10 mg/kg, p.o. は、投与後の 2.5 時間にわたり灌流液に回収された ACh 量において Vehicle 投与群に対して高値を示した (Fig. 6a). Tacrine は 1 mg/kg, p.o.では、Vehicle 群に比較して灌流液に回収された ACh 量に有意な作用は見られなかったが、3 mg/kg, p.o. においては投与後 1 時間後に基底状態の 345 % にまで増加し、投与 3 時間後まで、Vehicle 群に対して有意な増加作用を示した (Fig. 6b).

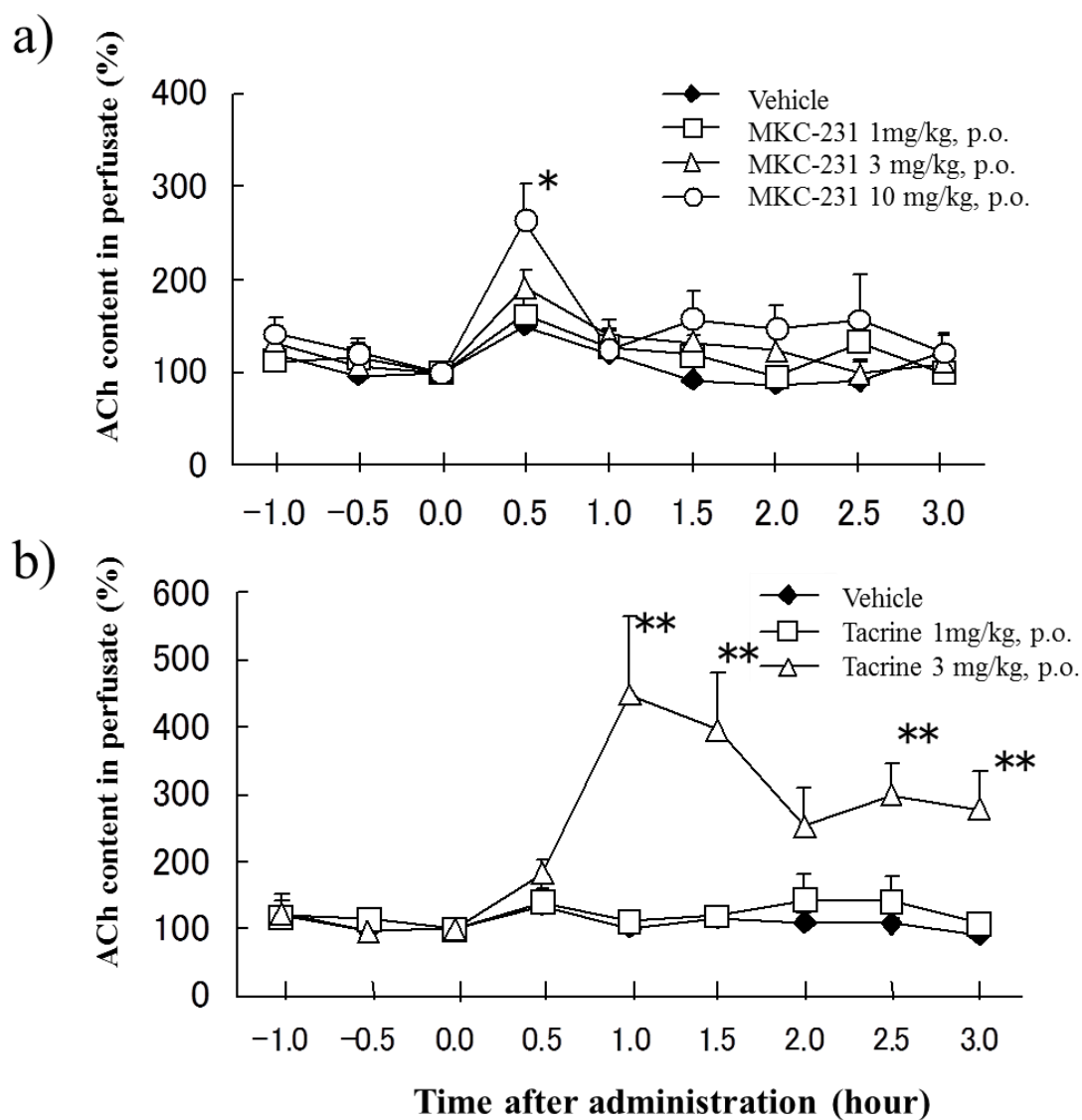


Fig.6 Effect of MKC-231 (a) and tacrine (b) on the ACh content in the perfusate from the hippocampus of conscious, freely moving AF64A-treated rats. Values are shown as mean \pm S.E.M. (n=8 in MKC-231, n=6 in tacrine). *; p<0.05, **; p<0.01 vs vehicle (Dunnett's two-tailed test)

2.4 考察

これまでに、MKC-231 はコリン作動性神経機能の低下したモデル動物において学習記憶障害改善作用を有するコリン作動性神経活性化薬として作用が報告されてきたが、その詳細な作用機序については不明のままであった (Bessho et al., 1996; Murai et al., 1994). この MKC-231 の pro-cholinergic な作用のメカニズムを明らかにする目的で、まず MKC-231 の ACh 合成と ACh 放出に対する作用を詳細に検討した.

最初に、AF64A 処置ラットから調製した海馬シナプトソームを用いた検討を行い、MKC-231 が HACU を促進し、神経終末内での ACh 合成を高める作用を持つことを示した. 新たに合成された ACh は $[^3\text{H}]\text{-ACh}$ として測定されるが、high- K^+ による脱分極刺激によって放出されたことから、神経終末内において刺激に応答する ACh の放出顆粒に蓄えられていることが明らかになった. また、MKC-231 は、high- K^+ 刺激用バッファーにのみ処置された場合には、 $[^3\text{H}]\text{-ACh}$ 放出には作用を示さなかったことから、ACh 放出のプロセスそのものに対しては影響していないことが示唆された. これらの実験結果から、MKC-231 の動物モデルにおける学習記憶障害改善作用の背景には、HACU の促進作用を介して神経終末内で ACh 合成を高め、神経伝達の活性化に伴う ACh 放出量を増大させることが、その機序として存在することが示唆された. Murai らの検討 (Murai et al., 1994) では、慢性投与により、AF64A 傷害マウス脳組織での ACh 含量の増加が報告されており、この ACh 合成促進作用は蓄積するものと考えられる.

可逆的な AChE 阻害剤である tacrine には、HACU や high-K⁺ 刺激によって放出される ACh 量について有意な影響は見られず、神経終末内での ACh の新規合成や ACh 放出を増やす作用はなく、コリン作動性神経系に対する作用について MKC-231 との相違点が明確になった。

次に、AF64A 傷害ラットより調製した海馬スライスを用いた検討では、MKC-231 は、繰り返し負荷された脱分極刺激による ACh 放出量の低下に対して、有意な改善作用を示した。Tacrine にはこのような作用は見られなかった。この実験においては、シナプス間隙に放出された ACh の分解を抑えるため、海馬スライスはあらかじめ、非可逆的な ChE 阻害剤である paraoxson によって処理され、灌流液中には海馬スライスにおける新規な ACh 合成のために十分な濃度の choline を含ませ、新規の ACh 合成の基質とした。この実験条件で、灌流液にて測定される ACh 量は、海馬スライスにおける ACh 合成能を反映するものであると考えられ、海馬シナプトソームにおける実験でも示したように、MKC-231 は ACh 合成を高め、脱分極刺激による ACh 放出量を増やしたものと考えられた。Ch が欠乏した状態における、新規の ACh 合成は phospholipid の分解による Ch の供給によって維持され、シナプス膜における phosphatidylcholine も分解を受けることが報告されており、このような膜の機能を損なうような自己分解は、細胞の生存や機能にも大きな影響を与える (Buyukuysal, Holmes, & Wurtman, 1991; Ulus, Wurtman, Mauron, & Blusztajn, 1989). MKC-231

により神経終末で細胞外の Ch の利用率を高めることができれば、シナプス膜の phospholipid の分解を防ぎ、細胞保護に働くことが期待できるものと考えられる。

最後に、AF64A 処置ラットの海馬での覚醒下非拘束条件のマイクロダイアリシスにおいて、MKC-231 の作用を検討した。シナプス間隙において ChE は非常に効率的に ACh を分解するため、ACh を測定する *in vivo* マイクロダイアリシスにおいては ChE 阻害薬をその灌流液中に含ませることが多い。しかし、灌流液への ChE 阻害薬の添加は、artificial なコリン作動性神経の活性化を引き起こし、その条件下での薬物の作用検討を困難にする (de Boer, Westerink, & Horn, 1990; Kawashima et al., 1991)。そのため、この実験においては、高感度の RIA を ACh の分析に用いることで、ChE 阻害薬を灌流液中に添加することなく、マイクロダイアリシスを行った。灌流液に回収される ACh 量は、海馬内に刺入されたプローブ膜の近傍の細胞外濃度を反映しているものと考えられる。この手法で測定される基底状態の ACh 量は、Kawashima ら (Kawashima et al., 1994) により正常ラットで 103.1 ± 3.6 fmol/30 min と報告されている。我々の実験では、AF64A 処置ラットにおいて、 62.9 ± 17.0 fmol/30 min (MKC-231 の検討での vehicle 群) 及び 71.6 ± 13.3 fmol/30 min (tacrine の検討での vehicle 群) であり、正常ラットで報告されている値から 30-40 %低い値となった。MKC-231 の経口投与により、投与直後から 30 分間で灌流液中に回収される ACh 量が用量依存的に増加し、その作用は 10 mg/kg, p.o.投与では有意であった。MKC-231 の

作用は短時間のピークを伴ったものであるが、その後 10 mg/kg, p.o.投与群では、基底状態の ACh 量においてやや増加したレベルを維持した。Tacrine は、灌流液中回収される ACh 量に関し、MKC-231 に比較してより強く、持続的な作用を示し、3 mg/kg, p.o.の投与においてその作用は有意であった。今回の検討より、tacrine の ACh 量に対する作用は明確であるが、tacrine は AF64A 処置ラットの迷路学習障害に対して改善作用を示さず (Bessho et al., 1996)、AF64A 処置マウスにおいても、迷路学習における障害に対して改善作用を示さなかったことが報告されている (Murai et al., 1994). また、ChE 阻害薬は、AF64A によって誘発されたコリン作動性神経の機能低下モデルにおいては効果が弱いとの報告もある (Smith, 1988).

本章における検討結果から、MKC-231 は、AF64A 処置ラットの神経終末においてプレシナプスからの神経活動のインパルスの流れを強める作用があるものと考えられた。一方で、ChE 阻害薬では、AF64A 処置ラットの神経終末において、ChE の阻害によって基底状態の ACh 量を過剰に高めていることが考えられた。AF64A 処置動物においては、プレシナプスの傷害が顕著であるとされており、このモデルにおける障害の改善にはプレシナプスの活性化がより適した方法である可能性が考えられた。

2.5 要約

MKC-231 が ACh 代謝回転に及ぼす影響を明らかにする目的で、AF64A 処置ラットを用いて、ACh 合成と ACh 放出に対する MKC-231 の作用を検討した。海馬シナプトソーム、海馬スライス、in vivo マイクロダイアリシスによる実験から、MKC-231 は神経終末の HACU の促進を介して、ACh の新規合成を高め、神経刺激に応答する ACh 放出量の低下を改善する作用を示すことが明らかとなった。対照薬として評価した AChE 阻害剤である tacrine は、シナプス間隙の ACh 濃度を高める作用があるものの、神経終末において ACh 合成を高める作用や刺激に応じて放出される ACh 量を増大させる作用は無く、このことが、このモデルを用いた行動薬理試験での MKC-231 と tacrine の記憶学習障害改善作用の相違の一つの原因である可能性が考えられた。

第3章 HACU 促進作用のメカニズムの解析

3.1 緒言

本章においては、第2章において確認された MKC-231 の HACU 促進作用のメカニズムについて、複数の手法を用いた検討、考察を行った。

初めに、高親和性コリントランスポーターの特異リガンドである $[^3\text{H}]$ -HC-3 を用いた放射性リガンド結合試験を行った。HC-3 はシナプトソームの表面上にあるコリントランスポーターに結合する。そこで、MKC-231 を処置したシナプトソームを用いて $[^3\text{H}]$ -HC-3 結合試験を行いその作用を検討するとともに、Scatchard plot により K_d 値及び B_{max} 値を算出し、結合親和性、結合サイト数の観点からその作用様式を検討した。

HC-3 に感受性のある高親和性コリントランスポーターとして、CHT1 が同定されている (Okuda et al., 2000)。そこで次に、MKC-231 が CHT1 に対して直接的な結合親和性を持つ可能性について、CHT1 を発現した COS7 細胞膜を用いて、 $[^3\text{H}]$ -MKC-231 結合試験及び、Biacore 法を用いた結合親和性試験を行った。

3.2 材料および方法

3.2.1 動物

実験には Wistar 系雄性ラット（日本医科学動物資材研究所(株)）を用いた。ラットは 12 時間ごとの明暗サイクルの条件下で、餌と水は自由に摂取させた。動物実験は、田辺三菱製薬動物実験委員会の定める倫理指針に従って実施された。

3.2.2 試薬

MKC-231, M-MKC-231 (MKC-231 のラセミ体主代謝物; N-(2,3-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydro-furo[2,3-b]quinolin-4-yl)-2-(2-hydroxy-5-oxo-pyrrolidin-1-yl)acetamide), ethylcholine mustard aziridinium-picrate (AF64A の前駆物質) は、田辺三菱製薬にて合成されたものを用いた。MKC-231 及び M-MKC-231 の構造式を Fig.7 に示した。[³H]-MKC-231 は、第一化学薬品にて合成したものを用いた。[³H]-Ch, [³H]-HC-3 は PerkinElmer (Wellesley, MA) より、HC-3, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) は、Sigma-Aldrich (St.Louis, MO) より、Fetal bovine serum (FBS), pcDNA3.1 (+) は、Invitrogen (Carlsbad, CA) より、The Rat Brain Stem-Spinal Cord Lambda cDNA Library は、Stratagene (La Jolla, CA) より、TransIT-LT1 は、Mirus Bio Corporation (Madison, WI) より、ラットポリクローナル抗 CHT1 抗体

(AB5966) は Chemicon International, Inc. (Temecula, CA) より、ECL western blotting detection reagent は Amersham Pharmacia biotech (New Jersey, USA) より購入した。その他の試薬についても、市販品を購入して用いた。

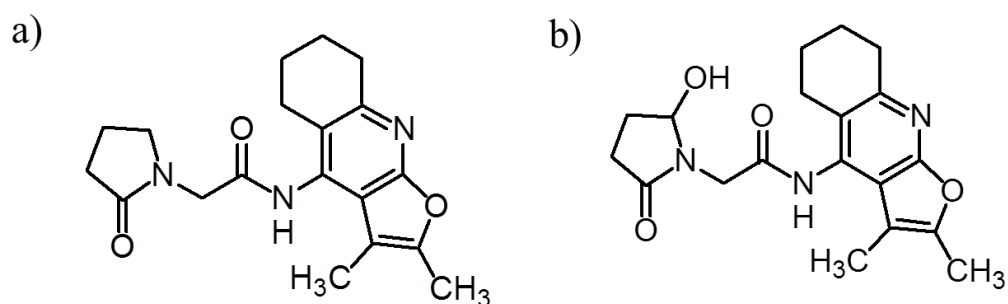


Fig.7 Chemical structure of MKC-231 (a) and M-MKC-231 (b)

3.2.3 AF64A の調整方法

AF64A の調製は、2.2.3 に示した方法により行った。

3.2.4 手術

ラットに対する AF64A の脳室内投与手術は、2.2.4 に示した方法により行った。

3.2.5 M-MKC-231 の HACU への作用の検討

HACU の測定は、Simon and Kuhar の方法 (Simon & Kuhar, 1975) に準じて行った。ラットを断頭後、脳を速やかに摘出して、氷冷したステージ上にて海馬を切り出した。ラット 1 匹分の海馬を 2.0 ml の氷冷した 0.32 M sucrose 溶液で、ガラス-テフロンホモジナイザーによってホモジナイズし、冷却遠心分離 (4 °C, 1000 X g, 10 分間) の後上清をとり、さらに冷却遠心分離 (4 °C, 20,000 X g, 20 分間) し得られた沈渣 (P2 フラクション) を 1.5 ml の氷冷した 0.32 M sucrose 溶液で再懸濁したものを海馬シナプトソームとして以下の実験に用いた。HACU の測定には、100 μ l の海馬シナプトソームを 800 μ l の 15.8 mM Na⁺-K⁺ phosphate buffer (pH 7.4; 組成 (mM): NaCl, 126; KCl, 4.75; MgCl₂, 1.42; CaCl₂, 1.27; dextrose, 11.1) に添加し、30 分間、37 °C のプレインキュベーションを行った後、100 μ l の [³H]-Ch 溶液を反応液中の最終濃度が 0.1 μ M になるように添加し、37 °C で 10 分間 [³H]-Ch 取り込みを行わせた。反応は、氷冷にすることで停止させ、さらに 2 ml の氷冷した 15.8 mM Na⁺-K⁺ phosphate buffer を反応液に加えた。このサンプルをセルハーベスター (BRANDEL, Gaithersburg, MD) を用いて、GF/B filters (Whatman International Ltd., Maidstone, KY) 上に濾取して、4 ml の氷冷した生理食塩水にて 2 回洗浄し、フィルター上の放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。HACU は、こうして得られた [³H]-Ch の取り込み量から、10 μ M HC-3 を添加した sodium-free buffer での [³H]-Ch

取り込み量を引くことで算出した． Sodium-free buffer は、15.8 mM $\text{Na}^+\text{-K}^+$ phosphate buffer の組成から、NaCl と Na_2HPO_4 を sucrose (252 mM) と Tris-phosphate (15.8 mM) に置き換えたものである． M-MKC-231 は DMSO にて溶解し、アッセイバッファー中に DMSO の最終濃度が 0.01 μM になるように添加した． サンプルの蛋白質定量は、DC Protein Assay reagents (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いた方法で行った．

3.2.6 [^3H]-HC-3 結合試験による検討

[^3H]-HC-3 結合試験は、Quirion の方法(Quirion, 1987) に準じて行った． 4 匹のラットから摘出した海馬を 8.0 ml の氷冷した 0.32 M sucrose 溶液でガラス-テフロンホモジナイザーによってホモジナイズし、冷却遠心分離 (4 °C, 1000 X g, 10 分間)の後上清をとり、さらに冷却遠心分離 (4 °C, 48,300 X g, 20 分間) し得られた沈渣 (P2 フラクション) を 9.0 ml の氷冷した 15.8 mM $\text{Na}^+\text{-K}^+$ Phosphate buffer (pH 7.4) に再懸濁したものを海馬シナプトソームとして以下の実験に用いた． 海馬シナプトソームを 37 °C で 10 分間、プレインキュベーションしたのち、15.8 mM $\text{Na}^+\text{-K}^+$ Phosphate buffer (pH 7.4) に溶解した MKC-231 又は溶媒を試験濃度に合わせて添加し、さらに 30 分間、37 °C でインキュベーションした後、冷却遠心分離 (4 °C, 48,300 X g, 20 分間) により反応を停止させた． 得られた沈渣を 300 mM NaCl を含有する 50 mM Tris-HCl

buffer (pH 7.4) にて 1 回洗浄したのち、再懸濁を行い再度、海馬シナプトソームを得た。 [^3H]-HC-3 結合試験では、300 mM NaCl を含有する 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) をアッセイバッファーとして、250 μl の海馬シナプトソームに 200 μl のアッセイバッファーと 50 μl の [^3H]-HC-3 溶液を加えて 500 μl として反応を行なった。 [^3H]-HC-3 濃度を 1.0 nM から 32.0 nM に振って結合特性を検討し、8 nM で、MKC-231 (10^{-12} - 10^{-6} M) の影響を検討した。 インキュベーションは 4 °C で一晩行い、翌日、セルハーベスターを用いて、0.1 % polyethyleneimine に浸した GF/B filters 上にサンプルを濾取して、4 ml の氷冷したアッセイバッファーにて 4 回洗浄した。 フィルター上の放射能は液体シンチレーションカウンターにて測定し、 [^3H]-HC-3 の特異結合は、10 μM の非標識 HC-3 存在下での結合を非特異結合として総結合より引くことにより算出した。 [^3H]-HC-3 の K_d 値、 B_{max} 値は、Scatchard plot analysis によって求めた。

3.2.7 CHT1 発現 COS7 細胞の調製

高親和性コリントランスポーター (CHT1) の cDNA を rat brain stem-spinal cord lambda cDNA library より単離し、トランスフェクション用の発現ベクターである pcDNA3.1 (+)-CHT1 を調製した。 COS7 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に 10 % FBS を加えた培地で、poly-L-lysine コートした 100 mm のプラスチックディッシュにて培養した。 COS7 細胞に Trans IT-LT1 を用いて pcDNA3.1

(+)-CHT1 のトランスフェクションを行い、2 日間培養の後、セミコンフレントの状態になったところで、PBS により細胞表面をリンスし、 -80°C にてディッシュごとアッセイまで保存した。このとき、トランスフェクションを行わない COS7 細胞も同時に用意して以下の実験のコントロールとして用いた。COS7 細胞における CHT1 の発現は、抗 CHT1 抗体である AB5966 を用いたウェスタンブロットと $[^3\text{H}]\text{HC-3}$ binding assay により確認した。ウェスタンブロットでは、細胞のホモジネートを Laemmli sample buffer (1 % SDS, 31.3 mM Tris, pH 6.8, 5 % glycerol, 200 mM 2-mercaptoethanol) にて 37°C , 15 分間の条件で蛋白変性させ、常法により SDS-PAGE にて展開後 polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜上にブロットした。得られた PVDF 膜は、5 % スキムミルク, 0.5 % Tween-20 を含む TBS-T にてブロッキングを行い、1 次抗体 AB5966 は 0.5 % スキムミルク, 0.5 % Tween-20 を含む TBS-T にて 800 倍希釈して処置し、一晚反応させた。1 次抗体の検出には、2 次抗体 (2500 倍希釈の horseradish peroxidase-conjugated) を用いた。PVDF 膜を TBS-T にて洗浄後、ECL kit を用いて免疫反応性を示したバンドをデンストメーターである LAS1000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) で検出し、Science Lab 2001 Image Gauge software (Version 4.0; Fuji Photo Film) にて解析した。CHT1 の発現の確認については、3.2.6 に準じた $[^3\text{H}]\text{-HC-3}$ 結合試験によっても行った。

3.2.8 CHT1 発現細胞膜における [³H]-MKC-231 結合試験

[³H]-MKC-231 結合試験では、アッセイバッファーとして、300 mM NaCl を含有する 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を用いた。凍結保存した CHT-1 発現細胞の培養皿に 500 μ l のアッセイバッファーを加え、セルスクレイパーで細胞をかき集めて、5 皿分をまとめて、ガラス-テフロンホモジナザーにて 10 回、ゆっくりとホモジナイズした。この細胞破碎液を Tris buffer で希釈して 3.2ml とし CHT1 発現膜標品とした。CHT1 発現膜 250 μ l をアッセイバッファーで希釈して、濃度範囲を振った [³H]-MKC-231 添加し、500 μ l となるようにした。反応は 4 °C で一晩行ない、0.1 % polyethyleneimine 溶液にあらかじめ浸した GF/B filter 上に濾取することで反応を停止し、フィルターは 4 ml の氷冷したアッセイバッファーにて 3 回洗浄した。フィルター上の放射能は液体シンチレーションカウンターにて測定した。特異結合は、総結合から、非標識の 10 μ M MKC-231 存在下での結合を引くことで求めた。Scatchard plot analysis により、Kd 値 及び Bmax 値を算出した。

3.2.9 Biacore 法を用いた結合親和性試験

セミコンフレントに培養された CHT1 発現 COS7 細胞を、培養皿あたり 2 ml の 30 mM HEPES buffered saline (150 mM NaCl, pH 7.4, 4 °C; HBS)、10 μ l の 200 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) 溶液を添加して、セルスクレイパーで掻き集め

た. 4 皿分の細胞をまとめてガラス-テフロンホモジナザーにて 10 回、ゆっくりとホモジナイズして細胞破碎液を調製し CHT1 発現膜標品とした. CHT1 発現膜標品は実験に使用するまで -80°C にて保存した. 被験薬である MKC-231, M-MKC-231 及び HC-3 は HEPES-Buffered-Saline (HBS) にて溶解し、HC-3 を陽性対照薬として用いた.

Biacore assay は、Cooper らの方法(Cooper, Hansson, Lofas, & Williams, 2000)に準じて行った. BIACORE X (Biacore AB, Neuchâtel, Switzerland) に Sensor Chip L1 (L1-chip) を装着し、surface plasmon resonance (SPR) response を測定した. L1-chip は膜蛋白の結合試験用に開発されたセンサーチップで、細胞の破碎液をセンサー上に脂質二重膜として再構成、固定することができる. HBS を移動相として $2\text{ }\mu\text{l/min}$ の流速で流し、細胞膜の固定においても細胞破碎液を $2\text{ }\mu\text{l/min}$ で流して固定した. L1-chip には、サーファクタントとして $40\text{ }\mu\text{l}$ の 20 mM octyl glucoside (OG) を用いて処理した後、 $80\text{ }\mu\text{l}$ の CHT1 発現細胞破碎液を注入して、L1-chip 上に脂質二重膜からなる L1-chip (CHT1 sensor) を形成した. トランスフェクションを行わない COS7 細胞から調製した細胞破碎液を実験のコントロールとして用い、別の L1-sensor chip 上に同様に固定した (Reference sensor). SPR の反応が安定したところで、被験薬を含む溶液を CHT1 sensor 及び Reference sensor に対して注入した. SPR の反応について、L1-chip に対する被験薬の結合曲線、解離曲線と、被験薬の注入前後での SPR の反応の差 (ΔRU) を計測した.

3.2.10 データ解析

Scatchard plot による解析により、 $[^3\text{H}]$ -HC-3 結合、 $[^3\text{H}]$ -MKC-231 結合の K_d 値及び B_{max} 値を算出し、 $[^3\text{H}]$ -HC-3 結合については、 K_m 値及び V_{max} 値における統計的有意差を t-test (Normal vs. vehicle) 及び、分散分析で有意であった場合に Dunnett's multiple comparison test (vehicle vs. MKC-231 treated groups) にて検討した。 $[^3\text{H}]$ -HC-3 結合において MKC-231 の作用を検討した試験では、統計的有意差を t-test (Normal vs. vehicle) 及び sample X dose two-way ANOVA で有意な場合 Dunnett's multiple comparison test (vehicle vs. drug treated groups) で検討した。Biacore 法による分析では、個々の実験で得られた被験薬物の SPR の結合曲線から k_a 値及び k_d 値を BIAevaluation 3.0 (Biacore AB, Neuchâtel, Switzerland) を用いて simultaneous curve fitting 法で算出した。解析はこの手法の感度の限界を考慮して、 ΔRU が 10 RU 以上である場合においてのみ行った。被験薬とセンサーの親和性は、 K_d 値として以下の数式により算出される： $K_d = k_d / k_a$ 。結合曲線のフィッティングにおいて得られる相関係数である Chi-square は、シグナルノイズの平均値を示しており、フィッティングの当てはまりの良さを示す指標である。製造元の作製したハンドブックに拠ると、Chi-square が 10 以下であることがよい実験条件であるとされることが記載されており、今回の試験においても Chi-square が 10 以下で得られた実験結果を意味があると考えた。

3.3 結果

3.3.1 HACU の測定

AF64A 処置ラット海馬シナプトソームにおける HACU に対する MKC-231 のラセミ体主代謝物である M-MKC-231 の作用を検討した (n=6). AF64A 処置により、HACU は 50%以下に低下したが、M-MKC-231 (10^{-12} - 10^{-5} M) は、いずれの用量においても作用を示さなかった (data not shown).

3.3.2 [3 H]-HC-3 結合試験による検討

ラット海馬における [3 H]-HC-3 結合における MKC-231 の作用を検討した (Fig. 8). HC-3 は選択性の高い高親和性コリントランスポーターの阻害薬とされる化合物である. 正常動物では、MKC-231 (10^{-12} - 10^{-6} M) は [3 H]-HC-3 結合に対して有意な作用を示さなかった (Fig. 8a). AF64A 処置動物においては、 [3 H]-HC-3 結合は正常動物の 50 % 程度有意に低下し、MKC-231 (10^{-12} - 10^{-6} M) は、この低下に対して正常動物の 70 % 程度までの回復を示し、その作用は 10^{-10} - 10^{-6} M において有意であった (Fig. 8b). Table 1 に Scatchard analysis の結果を示した. 海馬シナプトソームにおいて AF64A 処置により、 B_{max} が有意な低下を示すのに対して、 K_d 値には影響は見られなかった. MKC-231 (10^{-8} 及び 10^{-6} M) は B_{max} 値を有意に増加させる作用を示し、そのとき、

Kd 値は有意ではないが値が大きくなる影響が見られた。

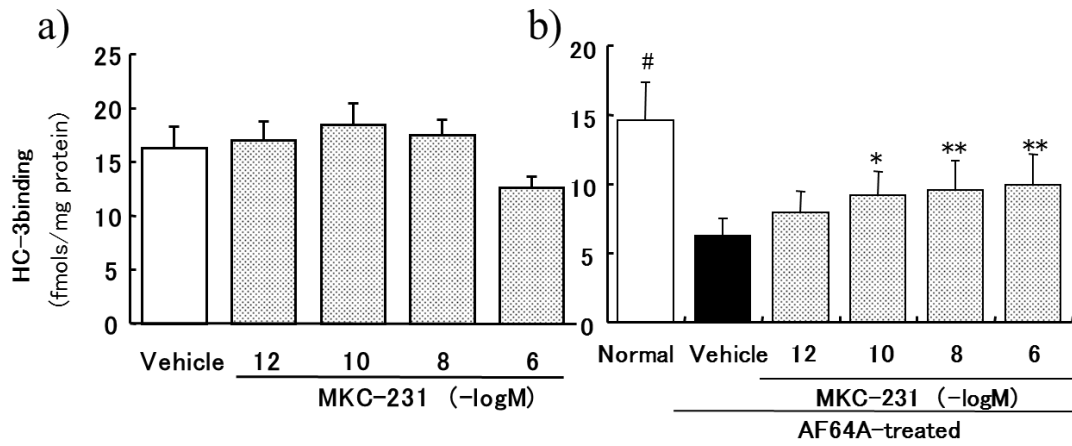


Fig.8 Effect of MKC-231 on hemicholinium-3 binding in hippocampal synaptosomes of normal (a) and AF64A-treated rats (b). Rat hippocampal crude synaptic synaptosomes were incubated (37 °C, 30 min) in the absence (vehicle) or presence of MKC-231 (varying the concentration from 1 pM to 1 μM). The aliquot of the synaptosomes was washed once and [3H]-HC-3 binding assay was conducted at 8nM of [3H]-HC-3. Specific binding was calculated as the difference in radioactivity bound in the presence and absence of 10 μM unlabeled HC-3. Results are shown as mean \pm S.E.M. (n=6 for normal rats and n=9 for AF64A-treated rats). #; p<0.05, vs vehicle (t-test), *, p<0.05, **, p<0.01, vs vehicle (Dunnett's test)

Table 1 Effect of MKC-231 on [³H]-HC-3 binding in AF64A-treated rat hippocampal synaptosomes

| Treatment of animals | Drugs | K _d (nM) | Bmax (fmol/mg of protein) |
|----------------------|-----------------|------------------------|------------------------------|
| Normal | Vehicle | 7.2 ± 1.1 | 37.1 ± 6.9 # |
| AF64A | Vehicle | 8.3 ± 1.9 | 18.2 ± 2.8 |
| AF64A | MKC-231 1.0 μM | 12.0 ± 3.5 | 30.3 ± 5.9 * |
| AF64A | MKC-231 0.01 μM | 12.5 ± 3.5 | 28.3 ± 3.1 * |

Rat hippocampal crude synaptic membrane preparations were incubated (37 °C, 30 min) in the absence (vehicle) or presence of MKC-231 (1.0 μM and 0.01 μM). The aliquot of the membrane preparations was washed once and a [³H]-HC-3 binding assay was conducted with varying [³H]-HC-3 concentrations from 1.0 nM to 32.0 nM. Specific binding was calculated as the difference in radioactivity bound in the presence and absence of 10 μM unlabeled HC-3. Values of K_d and Bmax of [³H]-HC-3 binding were determined using the Scatchard plot analysis. Results are shown as mean±S.E.M. (n=4). #; p<0.05 vs vehicle-AF64A (t-test) and *; p<0.05 vs vehicle-AF64A (Dunnett's test)

3.3.3 [³H]-MKC-231 結合試験

CHT1 発現 COS7 細胞の細胞膜における [³H]-MKC-231 結合を検討した。CHT1 の細胞での発現を、抗 CHT1 抗体を用いた免疫染色にて確認した (Fig. 9)。CHT1 の染色バンドは 45 kDa 付近に見られ、それよりやや高い位置に見られるバンドも糖鎖修飾された CHT1 のバンドであると考えられた (Ferguson et al., 2003)。 [³H]-HC-3 結合においても CHT1 発現細胞において 24.2 fmol/mg of protein の特異結合が見られ、CHT1 を

発現させていないコントロールの細胞では 2.4 fmol/mg of protein であった.

[³H]-MKC-231 は、CHT1 発現細胞において 150 nM [³H]-MKC-231 を用いた結合試験で 56.6 % の特異結合を示し、Scatchard analysis によって算出された K_d 値 及び B_{max} 値はそれぞれ、 4.7×10^{-7} M 及び 134.9 fmol/mg of protein (n=3, correlation coefficient r= -0.825 to -0.881) であった. [³H]-MKC-231 は、コントロールにおいた CHT1 非発現細胞においては、特異結合は見られなかった (Fig. 10).

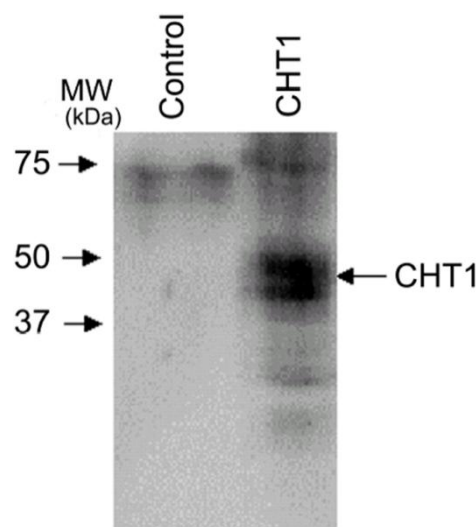


Fig.9 The anti-CHT1 polyclonal antibody (AB5966) recognized CHT1 protein in the lysate of CHT1-transfected COS7 cells but not in non-transfected control cells. Western blot analysis indicates the level of CHT1 expression in transfected COS7 cells (18.75 µg/lane). CHT1-IR Bands were shown in a duplicated manner and might reflect glycosylation of CHT1, as reported by Ferguson et. al. (2003).

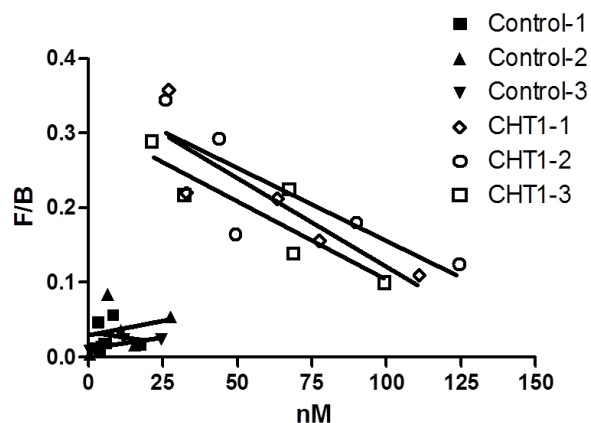


Fig.10 Scatchard plot analysis of the binding of $[^3\text{H}]$ -MKC-231 on cell lysates obtained from CHT1 (+) and CHT1 (-) COS7 cells. The Graph shows a representative experiment conducted with sister cultured cells. $[^3\text{H}]$ -HC-3 binding was 24.2 fmol/mg of protein in CHT1 (+) cells and 2.4 fmol/mg of protein in CHT1 (-) cells. $[^3\text{H}]$ -MKC-231 showed specific binding only to the CHT1 (+) cell lysates. Scatchard analysis revealed K_d and B_{max} were 4.7×10^{-7} M and 129.1 fmol/mg of protein (correlation coefficient $r = -0.88$).

3.3.4 Biacore 法を用いた結合親和性試験

MKC-231 が CHT1 に結合することを、CHT-1 発現 COS7 細胞の細胞膜を用い、Biacore assay によって確認した。実験に用いた CHT1 発現細胞及び非発現細胞の $[^3\text{H}]$ -HC-3 結合は、8 nM $[^3\text{H}]$ -HC-3 の条件でそれぞれ 57.0 ± 8.4 fmol/mg protein 及び 1.7 ± 1.3 fmol/mg protein であった。L1-chip によって Biacore assay にて測定される SPR response の time course を Fig.11 に示した。

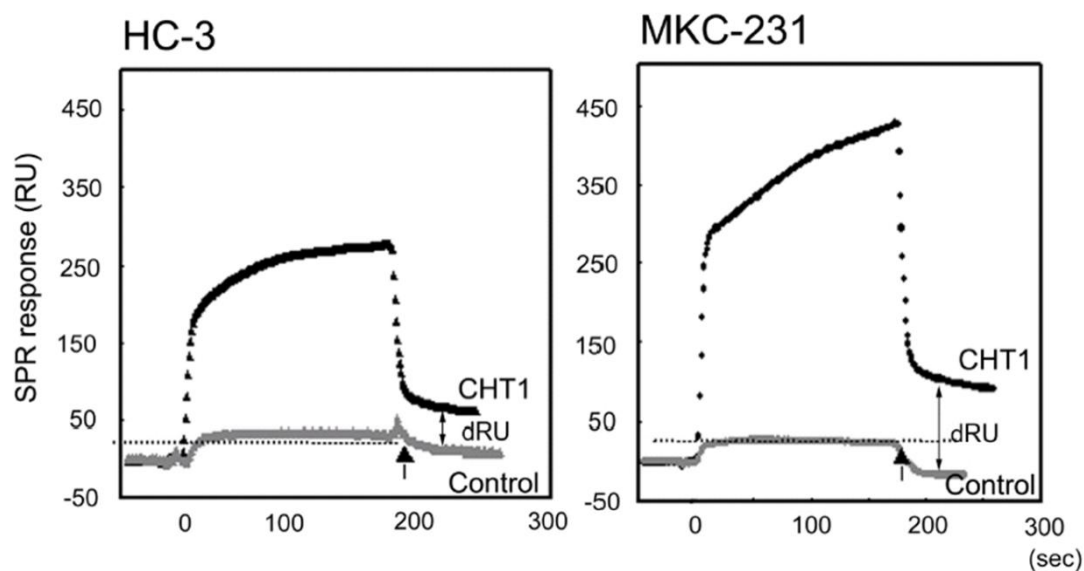


Fig.11 Representative processes of SPR response in L1-sensor chips in Biacore assay. HBS running buffer was replaced by each drug solution at Time 0 and returned to the running buffer at the time indicated by the arrows. Response of CHT1 transfected cell membranes and non-transfected control cell membranes were recorded. KD values were calculated using the simultaneous curve fitting of association and dissociation process of SPR response for each experiment.

MKC-231, HC-3 及び M-MKC-231 の CHT1 に対する特異結合の Kd 値を simultaneous curve fitting 法にて算出し、Table 2 に示した。この手法での HC-3 の Kd 値は約 10^{-9} M オーダーであると計算され、これは、 $[^3\text{H}]$ -HC-3 結合試験において算出される Kd と同程度であった。MKC-231 及び M-MKC-231 の Kd 値は約 10^{-9} M、 10^{-5} M 及び 10^{-6} M とそれぞれ算出された。

Table 2 Estimation of KD of compounds for CHT1 transfected cell membranes.

| Compounds | [M] | Δ RU | K _D (M) | Chi ² |
|-----------|--------------------------|-------------|-------------------------|------------------|
| MKC-231 | 1.00 X 10 ⁻⁸ | 43.6 | 1.84 X 10 ⁻⁹ | 3.61 |
| | 1.00 X 10 ⁻¹⁰ | 48.1 | 4.40 X 10 ⁻⁹ | 0.36 |
| | 2.00 X 10 ⁻¹² | 42.1 | 4.01 X 10 ⁻⁹ | 0.78 |
| | 3.00 X 10 ⁻¹² | 45.2 | 2.01 X 10 ⁻⁹ | 2.04 |
| HC-3 | 1.00 X 10 ⁻⁸ | 94.1 | 5.61 X 10 ⁻⁸ | 2.33 |
| | 1.00 X 10 ⁻⁹ | 18.8 | 1.52 X 10 ⁻⁸ | 0.24 |
| | 5.00 X 10 ⁻⁹ | 24.6 | 7.71 X 10 ⁻⁸ | 0.33 |
| | 1.00 X 10 ⁻¹⁰ | 13.3 | 1.77 X 10 ⁻⁸ | 0.11 |
| M-MKC-231 | 1.00 X 10 ⁻⁵ | 15.7 | 9.32 X 10 ⁻⁵ | 0.16 |
| | 1.00 X 10 ⁻⁶ | 53.0 | 1.65 X 10 ⁻⁵ | 0.19 |
| | 1.00 X 10 ⁻⁸ | 17.4 | 1.04 X 10 ⁻⁶ | 0.27 |

CHT1 transfected COS7 cell lysates were immobilized on the Biacore L1-chip and nontransfected sister culture cells were used as the control. The SPR response curve during association (ka) and dissociation (kd) of the drug with the L1-chip and residual SPR response (Δ RU) observed after treatment with the drug solution were measured. MKC-231, HC-3 and M-MKC-231 were estimated for their affinity (KD=ka/kd) to the CHT1 protein from curve fitting calculations using the BIAevaluation 3.0 (Biacore AB). Results are shown for each experiment in which different doses of the test drugs were employed.

3.4 考察

MKC-231 のプレシナプスにおけるコリン作動性神経賦活作用の詳細な機序解析を目的に実験を行い、今回、2 つの重要な知見を見出した。

一つ目は、*in vitro* での処置により MKC-231 は神経終末上で働く高親和性コリントランスポーター (CHT1) の数を増やす作用を有することを明らかにした。AF64A 処置ラット海馬シナプトソームを用いた [³H]-HC-3 結合試験ではトランスポーターの数の変化を示唆する Bmax 値の有意な増加が見られた一方で、Kd 値の変化は有意ではなく、親和性の変化ではないことが示された。正常動物の海馬シナプトソームでは、MKC-231 はこれらの指標に対して有意な作用は見られなかった。これまでの報告から、HACU においてトランスポーターの増加による機能の増強や、神経毒などの傷害からの回復は、余剰に蓄えられたトランスポーターを細胞質から細胞膜に引き出すことによって行われていることが示唆されてきた (Ivy, Newkirk, Karim, Mtshali, & Townsel, 2001; Rylett, Davis, & Walters, 1993)。CH1 が同定された後、HACU には、CHT1 のベシクル輸送を介した調節機構が存在し、CHT1 は ACh を含有する放出顆粒上に存在して開口放出の仕組みでシナプス膜上に組み込まれることが明らかにされ、CHT1 のシナプス膜上での数の増加には、ACh 放出の増加を伴うことが示唆されている (Ferguson & Blakely, 2004; Ferguson et al., 2003; Ribeiro et al., 2003)。また、CHT1 のエンドサイトシスのプロセスには clathrin に関連した分子機構が働いており、CHT1 の細胞膜

上での存在に制限を加えていることも示唆されている (Ribeiro et al., 2005; Ribeiro et al., 2006). この特徴的な調節機構は、これまでにコリン作動性神経の調節機構について見出されてきた事実、例えば、神経終末におけるコリントランスポーターの機敏な増加／減少や、コリントランスポートとアセチルコリン神経活性の密接な相関などを矛盾なく説明できる (Ferguson & Blakely, 2004; Ferguson et al., 2003; Ribeiro et al., 2003; Ribeiro et al., 2006). 今回の検討で、MKC-231 はシナプス膜上のトランスポーターの数を増やして HACU を促進していることが示されたが、この作用は、CHT1 のベシクル輸送システムに対する調整作用から説明が可能であると考えられた. AF64A 処置ラットでは、第 2 章の検討で、MKC-231 は放出刺激を加えるときに作用させても ACh の放出を増やすことが無かったことから (Takashina, Bessho, Mori, Eguchi, & Saito, 2008)、MKC-231 は CHT1 がシナプス膜表面上から取り込まれる過程を阻害する可能性が考えられる. MKC-231 のラットでの代謝半減期は 1 時間以下であるが、AF64A 処置ラットへの亜慢性の投与によって、薬物がすでに血中や脳中から消失した以降、例えば最終投与の 48 時間後においても、作用を持続的に示すことが報告されている (Bessho, Takashina, Eguchi, Komatsu, & Saito, 2008). AF64A 処置マウスにおいても、亜慢性の投与により長期間にわたる認知機能の改善作用と、海馬 ACh の低下に対する改善作用が最終投与の 20-24 時間後において見られている (Murai et al., 1994). これらの持越し効果は、MKC-231 の ACh 合成の促進と蓄積からも説明できるが、CHT1

のシナプス膜上の数の持続的増加という点からも説明できる作用であると考えられた。

二つ目の知見は、MKC-231 が CHT1 に対して直接的な結合親和性を持つことが、 $[^3\text{H}]$ -MKC-231 結合と Biacore 法による分析で明らかになったことである。Biacore 法による分析においては、センサーチップとして、L1-chip を選択した。L1-chip はその表面上に配置されたデキストラン主鎖とアルキル側鎖によって脂質二重膜を捉え固定できるセンサーであり、細胞破碎液などを再構成した脂質二重膜として固定することが可能である。これまでに、種々の薬物について、脂質膜との結合解析がこのセンサーチップによって行われている (Abdiche & Myszk, 2004)。今回の実験では、L1-chip によるセンサーを、CHT1 の発現、非発現細胞の破碎液を膜として流して固定することで個々の実験ごとに調製したため、 ΔRU は用いた細胞のコンディションや個々のアッセイにおける膜のセンサーへの固定過程の影響を受けて異なる値を示した。しかし、 ΔRU は、被験薬の K_d 値の算出には影響を与えず HC-3 の K_d 値は、Biacore 法による分析と $[^3\text{H}]$ -HC-3 結合試験とではほぼ同等の値を示した。従って、Biacore 法による分析は、妥当な予測値を示すものと考えられた。 $[^3\text{H}]$ -MKC-231 結合より得られた MKC-231 の K_d 値は約 10^{-7}M であり、Biacore 法による分析から推定された MKC-231 の K_d 値は約 10^{-9}M である。二つの値の差は、一部には、実験手法の違いを反映したものと考えられた。一つの可能性として Biacore 法による分析ではあらかじめサーファクタントである octyl glucoside を処置して膜に埋め込まれた CHT1 の構造が膜表面に出やすく

していることが挙げられ、このことによりアナライトである薬物が CHT1 に結合しやすくなった可能性が考えられた。別の可能性としては、Biacore のセンサーチップ上に膜が固定されることで、薬物は膜の内外の両方の CHT1 の構造に容易に結合が可能になり、特に、膜の内側に MKC-231 の結合サイトが存在した場合には、Biacore 法の方が薬物の結合には有利になった可能性が考えられる。MKC-231 の主代謝物（ラセミ体）である M-MKC-231 の検討も Biacore 法にて行った。M-MKC-231 は溶液中で容易に構造の転換が起きる化合物である。M-MKC-231 の CHT1 に対する K_d 値は、 10^{-5} - 10^{-6} M と算出され、CHT1 への結合は MKC-231 未変化体に比べて 1000 倍程度弱かった。M-MKC-231 (10^{-12} - 10^{-5} M) については、AF64A 処置ラット海馬シナプトソームにおける HACU についても検討を行ったが、有意な作用は見られなかった。以上の結果から、M-MKC-231 についてはラセミ体のどちらのフォームにおいても CHT1 への結合親和性は持たず、MKC-231 と CHT1 の直接的な結合は、その薬理学的作用を示す上で重要な役割を担っていることが示唆された。

第 2 章の検討において、MKC-231 の HACU の促進作用や高親和性コリントランスポーターの増加は AF64A 処置ラット海馬においてのみ見られ、正常ラットにおいては見られなかった。このことは、これまでの MKC-231 のコリン作動性神経系への作用に関する報告と一致する (Bessho et al., 1996; Murai et al., 1994)。このことを説明する一つの可能性として、シナプスにおける ACh 量の相違がその原因と考えることができ

る。HACU は ACh 合成の律速段階であるため、この ACh 量が HACU を実質的に調節して、シナプスにける ACh 濃度を適切に保っているという報告がある (Jenden, Jope, & Weiler, 1976)。AF64A の脳室内投与は、長期間にわたり、神経終末の ACh 量を減少させるため、十分な ACh が神経終末に蓄えられている正常動物に比べて、AF64A 処置動物では、薬理学的操作によって比較的容易にその活性を高めることができる可能性が考えられた。また、別の可能性として、MKC-231 が、シナプス膜上の CHT1 発現を抑制的に調節している、細胞質にある CHT1 のアンカー蛋白に影響している可能性が考えられる。そのようなアンカー蛋白として、prostate apoptosis response 4 (PAR-4) の報告があり、この蛋白は神経変性のモデル動物、AD や PD などの神経変性疾患においてその増加が報告されている (Guo et al., 1998; Xie & Guo, 2004)。CHT1 の C 末部の配列は HACU の調節に重要であることが示され、PAR4 や SEC14L1 (Ribeiro et al., 2007) などの細胞質蛋白が相互作用を持ち、CHT1 のシナプス膜上に発現を調整していることが報告されている。

以上の結果を踏まえて、MKC-231 の作用機序の可能性について模式図を Fig.12 に示した。

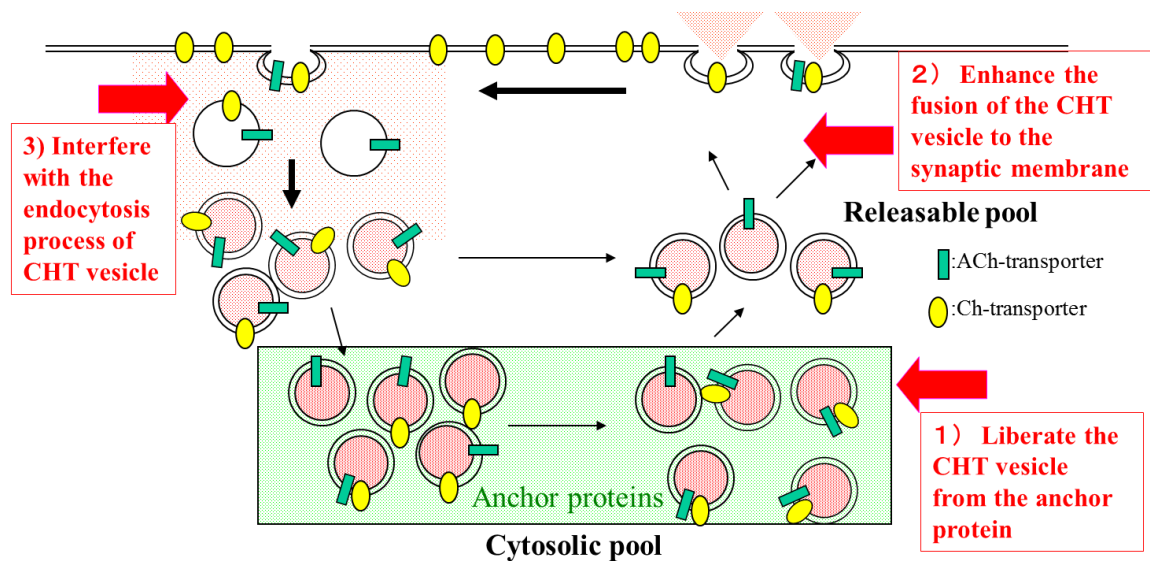


Fig.12 Hypothesis of the molecular target of MKC-231 in enhancement of HACU

MKC-231 の CHT1 活性調節における作用点の可能性としては、1) 細胞内に貯蔵された CHT1 のアンカー蛋白からの遊離、2) ACh 放出顆粒のシナプス膜への融合の促進、3) シナプス膜からの細胞内への再取り込過程の阻害の 3 点が考えられた。

3.5 要約

MKC-231 の HACU 促進作用のメカニズムについて、複数の手法を用いて詳細な検討及び考察を行った。海馬シナプトソームに対する $[^3\text{H}]$ -HC-3 を用いた放射性リガンド結合試験から算出した K_d 値及び B_{max} 値から、MKC-231 の HACU 促進作用は、シナプス膜上の高親和性コリントランスポーターの数を増やす作用に基づくことが示唆された。また、高親和性コリントランスポーター (CHT1) を発現させた COS7 細胞より調製した膜サンプルを用いて、 $[^3\text{H}]$ -MKC-231 結合試験及び、Biacore 法を用いた結合親和性試験を行い、MKC-231 が CHT1 に対して直接結合することが示され、その結合は薬理学的な作用の発現に重要な役割を持つ可能性が示唆された。CHT1 には、ベシクル輸送を介した調節機構が存在することが報告されており、MKC-231 はこのシステムに対する調節作用により、HACU 促進を介するコリン作動性神経活性の賦活作用を示している可能性が考えられた。

第4章 結論

AD 患者脳においては、顕著なシナプスの減少とシナプス機能の低下が報告されている(Coleman & Yao, 2003; Scheff & Price, 2003). コリン作動性神経系のプレシナプスの傷害は認知機能の障害と非常に強い関連性が示唆されており (Collerton, 1986; Rylett, Ball, & Colhoun, 1983; Sims et al., 1983)、コリン取り込みの速度はコリン作動性神経の活性と相関することは複数報告されている (Kuhar & Murrin, 1978; Simon, Atweh, & Kuhar, 1976; Yamamura & Snyder, 1973). また、今回検討した HACU 及び [^3H]-HC-3 結合は、AD 患者脳においても低下が報告されている (Kristofikova, Fales, Majer, & Klaschka, 1995; Rodriguez-Puertas, Pazos, Zarranz, & Pascual, 1994; Rylett et al., 1983). 今回の研究から、明らかになった MKC-231 のコリン作動性神経賦活作用とその作用機序は、ChE 阻害薬や他のコリン作動性神経の受容体刺激薬とは全く異なるものであり、AD 患者脳において得られている上記のような知見からも、その臨床効果を期待され、新しい治療手段を提供する可能性が考えられる. HACU を担う CHT1 の調節機構には、いまだ未解明の点が多く、今後の研究が進む中で MKC-231 の作用機序についても新たな説明が可能になるかも知れない. また、逆に CHT1 に直接的に作用し、HACU を調節する低分子化合物の報告は多くないことから、MKC-231 での知見がその解明に役立てることを期待している.

引用文献

- Abdiche, Y. N., & Myszk, D. G. (2004). Probing the mechanism of drug/lipid membrane interactions using Biacore. *Anal Biochem*, 328(2), 233-243. doi: 10.1016/j.ab.2004.01.018
- Bessho, T., Takashina, K., Eguchi, J., Komatsu, T., & Saito, K. (2008). MKC-231, a choline-uptake enhancer: (1) long-lasting cognitive improvement after repeated administration in AF64A-treated rats. *J Neural Transm*, 115(7), 1019-1025. doi: 10.1007/s00702-008-0053-4
- Bessho, T., Takashina, K., Tabata, R., Ohshima, C., Chaki, H., Yamabe, H., . . . Saito, K. (1996). Effect of the novel high affinity choline uptake enhancer 2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-N-(2,3-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrofuro[2,3-b]quinolin-4-yl)acetoamide on deficits of water maze learning in rats. *Arzneimittelforschung*, 46(4), 369-373.
- Buyukuysal, R. L., Holmes, T. C., & Wurtman, R. J. (1991). Interactions of 3,4-diaminopyridine and choline in stimulating acetylcholine release and protecting membrane phospholipids. *Brain Res*, 541(1), 1-6.

- Chrobak, J. J., Hanin, I., Schmechel, D. E., & Walsh, T. J. (1988). AF64A-induced working memory impairment: behavioral, neurochemical and histological correlates. *Brain Res*, 463(1), 107-117.
- Coleman, P. D., & Yao, P. J. (2003). Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 24(8), 1023-1027.
- Collerton, D. (1986). Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 19(1), 1-28.
- Cooper, M. A., Hansson, A., Lofas, S., & Williams, D. H. (2000). A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors. *Anal Biochem*, 277(2), 196-205. doi: 10.1006/abio.1999.4389
- de Boer, P., Westerink, B. H., & Horn, A. S. (1990). The effect of acetylcholinesterase inhibition on the release of acetylcholine from the striatum in vivo: interaction with autoreceptor responses. *Neurosci Lett*, 116(3), 357-360.
- Ferguson, S. M., & Blakely, R. D. (2004). The choline transporter resurfaces: new roles for synaptic vesicles? *Mol Interv*, 4(1), 22-37. doi: 10.1124/mi.4.1.22
- Ferguson, S. M., Savchenko, V., Apparsundaram, S., Zwick, M., Wright, J., Heilman, C. J., . . . Blakely, R. D. (2003). Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters. *J Neurosci*, 23(30), 9697-9709.

- Fisher, A., Mantione, C. R., Abraham, D. J., & Hanin, I. (1982). Long-term central cholinergic hypofunction induced in mice by ethylcholine aziridinium ion (AF64A) in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, *222*(1), 140-145.
- Gower, A. J., Rousseau, D., Jamsin, P., Gobert, J., Hanin, I., & Wulfert, E. (1989). Behavioural and histological effects of low concentrations of intraventricular AF64A. *Eur J Pharmacol*, *166*(2), 271-281.
- Guo, Q., Fu, W., Xie, J., Luo, H., Sells, S. F., Geddes, J. W., . . . Mattson, M. P. (1998). Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat Med*, *4*(8), 957-962.
- Hortnagl, H. (1994). AF64A-induced brain damage and its relation to dementia. *J Neural Transm Suppl*, *44*, 245-257.
- Ivy, M. T., Newkirk, R. F., Karim, M. R., Mtshali, C. M., & Townsel, J. G. (2001). Hemicholinium-3 mustard reveals two populations of cycling choline cotransporters in Limulus. *Neuroscience*, *102*(4), 969-978.
- Jarrard, L. E., Kant, G. J., Meyerhoff, J. L., & Levy, A. (1984). Behavioral and neurochemical effects of intraventricular AF64A administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *21*(2), 273-280.

- Jenden, D. J., Jope, R. S., & Weiler, M. H. (1976). Regulation of acetylcholine synthesis: does cytoplasmic acetylcholine control high affinity choline uptake? *Science*, *194*(4265), 635-637.
- Kasa, P., Rakonczay, Z., & Gulya, K. (1997). The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, *52*(6), 511-535.
- Kawashima, K., Hayakawa, T., Kashima, Y., Suzuki, T., Fujimoto, K., & Oohata, H. (1991). Determination of acetylcholine release in the striatum of anesthetized rats using in vivo microdialysis and a radioimmunoassay. *J Neurochem*, *57*(3), 882-887.
- Kawashima, K., Sato, A., Yoshizawa, M., Fujii, T., Fujimoto, K., & Suzuki, T. (1994). Effects of the centrally acting cholinesterase inhibitors tetrahydroaminoacridine and E2020 on the basal concentration of extracellular acetylcholine in the hippocampus of freely moving rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, *350*(5), 523-528.
- Kristofikova, Z., Fales, E., Majer, E., & Klaschka, J. (1995). (3H)hemicholinium-3 binding sites in postmortem brains of human patients with Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Exp Gerontol*, *30*(2), 125-136.
- Kuhar, M. J., & Murrin, L. C. (1978). Sodium-dependent, high affinity choline uptake. *J Neurochem*, *30*(1), 15-21.

Leventer, S., McKeag, D., Clancy, M., Wulfert, E., & Hanin, I. (1985).

Intracerebroventricular administration of ethylcholine mustard aziridinium ion (AF64A) reduces release of acetylcholine from rat hippocampal slices.

Neuropharmacology, 24(5), 453-459.

Murai, S., Saito, H., Abe, E., Masuda, Y., Odashima, J., & Itoh, T. (1994). MKC-231, a

choline uptake enhancer, ameliorates working memory deficits and decreased

hippocampal acetylcholine induced by ethylcholine aziridinium ion in mice. *J Neural*

Transm Gen Sect, 98(1), 1-13.

Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, H., Ishihara, T., & Katsura, I. (2000). Identification

and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci*, 3(2),

120-125. doi: 10.1038/72059

Potter, P. E., & Nitta, S. (1993). Alterations in modulation of acetylcholine release following

lesion of hippocampal cholinergic neurons with the neurotoxin AF64A.

Neuropharmacology, 32(6), 519-526.

Quirion, R. (1987). Characterization and autoradiographic distribution of hemicholinium-3

high-affinity choline uptake sites in mammalian brain. *Synapse*, 1(4), 293-303. doi:

10.1002/syn.890010403

- Ribeiro, F. M., Alves-Silva, J., Volkmandt, W., Martins-Silva, C., Mahmud, H., Wilhelm, A., . . . Prado, M. A. (2003). The hemicholinium-3 sensitive high affinity choline transporter is internalized by clathrin-mediated endocytosis and is present in endosomes and synaptic vesicles. *J Neurochem*, *87*(1), 136-146.
- Ribeiro, F. M., Black, S. A., Cregan, S. P., Prado, V. F., Prado, M. A., Rylett, R. J., & Ferguson, S. S. (2005). Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif. *J Neurochem*, *94*(1), 86-96. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03171.x
- Ribeiro, F. M., Black, S. A., Prado, V. F., Rylett, R. J., Ferguson, S. S., & Prado, M. A. (2006). The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. *J Neurochem*, *97*(1), 1-12. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03695.x
- Ribeiro, F. M., Ferreira, L. T., Marion, S., Fontes, S., Gomez, M., Ferguson, S. S., . . . Prado, V. F. (2007). SEC14-like protein 1 interacts with cholinergic transporters. *Neurochem Int*, *50*(2), 356-364. doi: 10.1016/j.neuint.2006.09.010
- Rodriguez-Puertas, R., Pazos, A., Zarranz, J. J., & Pascual, J. (1994). Selective cortical decrease of high-affinity choline uptake carrier in Alzheimer's disease: an autoradiographic study using 3H-hemicholinium-3. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, *8*(3), 161-169.

- Rylett, R. J., Ball, M. J., & Colhoun, E. H. (1983). Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res*, 289(1-2), 169-175.
- Rylett, R. J., Davis, W., & Walters, S. A. (1993). Modulation of high-affinity choline carrier activity following incubation of rat hippocampal synaptosomes with hemicholinium-3. *Brain Res*, 626(1-2), 184-189.
- Scheff, S. W., & Price, D. A. (2003). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging*, 24(8), 1029-1046.
- Schliebs, R., & Arendt, T. (2006). The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 113(11), 1625-1644. doi: 10.1007/s00702-006-0579-2
- Simon, J. R., Atweh, S., & Kuhar, M. J. (1976). Sodium-dependent high affinity choline uptake: a regulatory step in the synthesis of acetylcholine. *J Neurochem*, 26(5), 909-922.
- Simon, J. R., & Kuhar, M. G. (1975). Impulse-flow regulation of high affinity choline uptake in brain cholinergic nerve terminals. *Nature*, 255(5504), 162-163.

Sims, N. R., Bowen, D. M., Allen, S. J., Smith, C. C., Neary, D., Thomas, D. J., & Davison, A.

N. (1983). Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. *J Neurochem*, 40(2), 503-509.

Smith, G. (1988). Animal models of Alzheimer's disease: experimental cholinergic denervation. *Brain Res*, 472(2), 103-118.

Takashina, K., Bessho, T., Mori, R., Eguchi, J., & Saito, K. (2008). MKC-231, a choline uptake enhancer: (2) Effect on synthesis and release of acetylcholine in AF64A-treated rats. *J Neural Transm*, 115(7), 1027-1035. doi: 10.1007/s00702-008-0048-1

Terry, A. V., Jr., & Buccafusco, J. J. (2003). The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther*, 306(3), 821-827. doi: 10.1124/jpet.102.041616

Ulus, I. H., Wurtman, R. J., Mauron, C., & Blusztajn, J. K. (1989). Choline increases acetylcholine release and protects against the stimulation-induced decrease in phosphatide levels within membranes of rat corpus striatum. *Brain Res*, 484(1-2), 217-227.

- Xie, J., & Guo, Q. (2004). Par-4 inhibits choline uptake by interacting with CHT1 and reducing its incorporation on the plasma membrane. *J Biol Chem*, 279(27), 28266-28275. doi: 10.1074/jbc.M401495200
- Yamamura, H. I., & Snyder, S. H. (1973). High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. *J Neurochem*, 21(6), 1355-1374.

謝辞

本論文の作成にあたり、終始御懇切なる御指導、ご高配を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 教授・松木則夫博士、同准教授・池谷裕二博士に厚く御礼申し上げます。また本論文を審査いただきました諸先生方に深く感謝致します。

本研究は田辺三菱製薬株式会社にて行われました。本研究を進めるにあたり、常に適切な御指導とご鞭撻を賜りました斎藤健一博士、江口淳一博士、別所智子氏、森礼子氏、河合勲二博士に深く感謝申し上げます。また、マイクロダイアリシスの実験を行うにあたり、技術指導を賜りました共立薬科大学名誉教授 川島紘一郎博士（前共立薬科大学薬理学教室 教授）に多大なる感謝を申し上げます。