

## 論文の内容の要旨

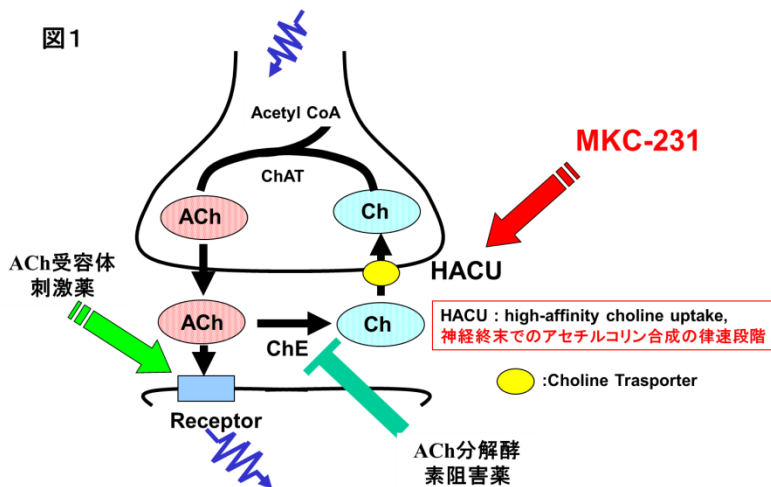
論文題目 高親和性コリン取り込み促進薬 MKC-231 の  
コリン作動性神経活性調節メカニズムに関する研究

氏名 高科 謙

### 【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、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のうち、コリン作動性神経の神経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、臨床的には、アセチルコリンエステラーゼ（AChE）阻害薬などコリン作動性神経機能を改善する薬物が認知機能低下の緩和に用いられている。

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が、AChE 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物である（図 1）。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た 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、種々の学習記憶障害モデル動物（AF64A



傷害モデル動物（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指標（HACU, 脳組織中 ACh 含量など）の改善が報告されている。しかし、MKC-231 の詳細な作用機序については、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いない。この作用機序を解明することは、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、その作用機序を検討した。

## 【内容】

### ① 神経終末におけるACh合成とACh放出に対するMKC-231の作用解析

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を用いた検討では、AF64A処置ラットから調製したシナプトソームに、MKC-231を30分間前処置し、放射ラベルしたコリン( $[^3\text{H}]\text{Ch}$ )の取り込みを行ったところ、 $10^{-8}\text{M}$ よりHACUの増加が確認された。このシナプトソームに高カリウムイオン濃度による脱分極刺激を負荷したところ  $10^{-8}\text{M}$ より $[^3\text{H}]\text{ACh}$ 放出の増加が確認され、HACUの促進が神経終末内でのAChの新規合成を促進し、作られたAChは放出顆粒に蓄えられていることが明らかになった。海馬スライスを用いた検討では、AF64A処置ラットより調製した海馬スライスを $10^{-6}\text{M}$ のChを含む人工脳脊髄液(ACSF)にて灌流し、灌流液を交替させることで高カリウムイオン濃度による脱分極刺激を繰り返しスライスに負荷させる実験系を考案した。海馬スライスは、あらかじめ非可逆的なAChE阻害薬であるparaoxson ( $10\mu\text{M}$ )で処置してAChのシナプス間隙での分解を抑え、灌流液中に回収されるACh量を定量することで、灌流液に添加した薬物のACh放出に対する作用を検討した。その結果、繰り返し刺激によって放出されるACh量の減少に対して、MKC-231の灌流液への添加は $10^{-8}\text{M}$ から抑制作用を示した。In vivoマイクロダイアリシスによる実験では、AF64A処置ラットにおいては、基底状態のACh量が正常動物に比べて30-40%程度低下したが、MKC-231の $10\text{ mg/kg.p.o.}$ 投与により、投与30分後に有意な増加が確認された。

以上のことから、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、このモデルにおける記憶学習記憶障害に対して、MKC-231が改善作用を示すのに対して、tacrineには作用が見られない一つの原因である可能性が考えられた。

### ② MKC-231のHACU促進作用のメカニズム解析

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検討及び考察を行った。初めに、ラット海馬シナプトソームを用いHACUの反応速度論的解析を、取り込み基質である $[^3\text{H}]\text{Ch}$ 濃度とHACUについてLineweaver-Burke plotを用いて行った。

AF64A 処置により、 $[^3\text{H}]\text{Ch}$  取り込みの  $V_{\text{max}}$  値が正常動物の約 50%にまで低下したのに対して、MKC-231  $10^{-8}\text{M}$  を 30 分間前処置することにより、その低下を約 80%にまで改善することが示された。  $K_{\text{m}}$  値に対しては有意な変化は見られなかった。 このことから、MKC-231 は Ch のトランスポーターへの親和性を変化させるのではなく、取り込み速度を高めて作用を発現していることが示唆された。 次に、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  $[^3\text{H}]\text{-Hemicholinium-3}$  (HC-3) を用いた結合試験を行った。 その結果、AF64A 処置により正常動物の約 50%に低下した  $[^3\text{H}]\text{-HC-3}$  結合が、MKC-231  $10^{-10}\text{M}$  の 30 分間前処置により約 70%にまで改善した。 Scatchard 解析から MKC-231 は  $[^3\text{H}]\text{HC-3}$  結合の  $B_{\text{max}}$  を有意に改善していることが示され、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。

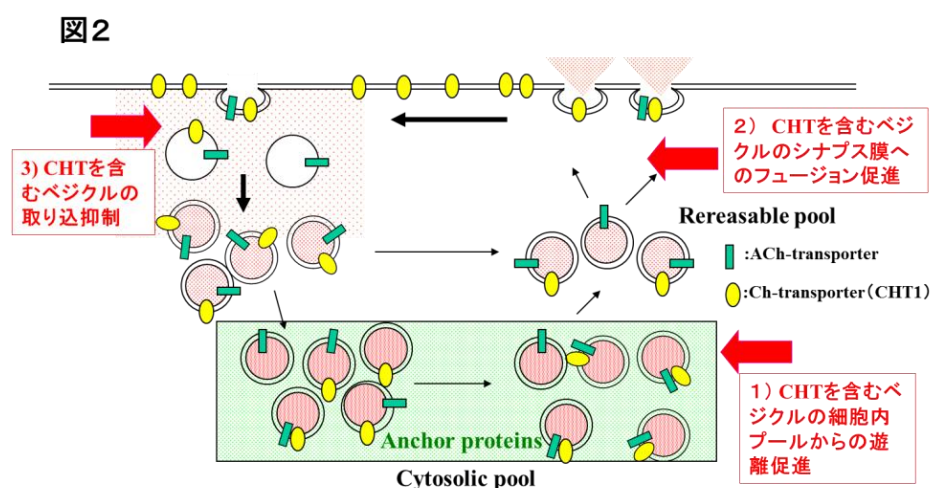
HACU は HC-3 感受性の高親和性コリントランスポーター (CHT1) により担われていることが報告されている。 そこで、CHT1 に対する MKC-231 の直接作用の有無を検討する目的で、CHT1 を発現させた COS7 細胞の膜サンプルを用いて、 $[^3\text{H}]\text{-MKC-231}$  結合試験及び、Biacore 法を用いた結合親和性試験を行った。  $[^3\text{H}]\text{MKC-231}$  結合試験では、 $[^3\text{H}]\text{MKC-231}$  の特異結合が観察され、Scatchard 解析を行ったところ、 $K_{\text{d}}$  値  $4.7 \times 10^{-7}\text{M}$ 、 $B_{\text{max}}$  値 129.1 fmol/mg of protein であった。 Biacore 法では、膜蛋白用に開発されたセンサーである L1-センサーチップを用い、CHT1 発現膜をセンサーチップに固定した CHT1 のセンサーを調製して化合物の結合親和性について検討した。 この手法において HC-3 は  $10^{-8}\text{M}$  オーダーの  $K_{\text{d}}$  値を示し、この値は  $[^3\text{H}]\text{HC-3}$  の結合試験で報告される  $K_{\text{d}}$  値と同程度であった。 この時、MKC-231 は  $10^{-9}\text{M}$  の  $K_{\text{d}}$  値を示し、強い親和性で CHT1 に直接結合し得ることが確認された。 MKC-231 の代謝物であり、HACU 促進活性が見られない M-MKC-231 についても同様な検討を行ったところ  $K_{\text{d}}$  値は  $10^{-5}\text{M}\text{-}10^{-6}\text{M}$  オーダーと、1000 倍程度親和性が弱いことから、この結合が薬物活性の発現の有無に関与する可能性が示された。

#### 【結語】

本研究により、MKC-231 は AF64A 処置ラットにおいて神経終末上の高親和性コリントランスポーターの数を増やし、HACU を促進すること、その結果、神経終末内での ACh の新規合成が高まり、神経刺激に応じた ACh 放出量の増大につながることを示された。 また、CHT1 の発現細胞膜を用いた解析からは、MKC-231 は CHT1 に対して *in vitro* での薬理活性を示す濃度と同程度の結合親和性を持ち、この結合が、薬理活性の発現に関与している可能性が示唆された。 CHT1 による HACU の活性調節機構の詳細については、いまだ不明な点が多いが、神経終末のサイトゾルには余剰な CHT1 が存在し、HACU の活性制御や神経毒などの傷害からの回復に関与していることや、神経終末において CHT1 は ACh の放出顆粒に存在しコリン作動性神経の活動依存的に神経終末の膜上に現れ機能すること、クラスリン被覆小胞を介してシナプス内へ再取り込みされることなどが報告されている。 図 2 にこれまでに得られている CHT1 による HACU の活性調節機構と本研究結果を踏まえた

MKC-231 の作用メカニズムを示した。CHT1 は、その C 末部を介して細胞内において種々のアンカー蛋白と相互作用して、HACU の活性に影響を与えていることが示唆されており、MKC-231 の CHT-1 への直接結合は、その詳細を明らかにできてはいないが、そうした相互作用に影響することで、1) に示した CHT1 を含むベジクルの細胞内プールからの遊離を促すなどして、このサイクルに参加する CHT1 の数を増やす作用を示している可能性が考えられた。また、膜表面上のトラスポーターの数を増やすという点からは、MKC-231 に直接 ACh を放出させる作用がないことから、主には、3) の CHT1 の細胞内への再取り込みを阻害する作用があるのではないかと考えられた。

この機序に従えば、MKC-231 が、その短い代謝半減期にも関わらず、連続投与での薬理作用の増強を示すことや、脳内濃度が薬理活性発現を期待できる濃度を下回った評価タイミングにおいても薬理作用が見られていることについても、薬物が CHT1 をシナプス膜上で増やす作用を示して消失した後も、増加した CHT1 が膜上に留まる期間、薬物の作用は見られるという解釈から説明することが可能になると思われた。



MKC-231 は正常動物の HACU や ACh 合成、ACh 放出には作用を示さなかった。臨床応用上は、傷害された神経終末において、すなわち、病

態においてのみ作用が期待されることになるが、その機序は明らかではなく、今後の重要な研究課題である。MKC-231 の薬理作用は AF64A 処置ラット以外の神経傷害モデルや加齢動物においても見られているが、そうした記憶障害モデル動物では、いずれも神経終末内の ACh 含量が低下している。神経終末内の ACh 含量が HACU の調節に大きな影響を与え、神経終末内の ACh 量とシナプス間隙の ACh 量を適正に維持しているという報告があることから、一つの可能性として、ACh 含量の低下によって薬理作用が発現しやすくなっている可能性が考えられた。また、アンカー蛋白が神経傷害に伴い発現増強し、そうした分子と CHT1 の間の相互作用に対して MKC-231 が影響することで薬物活性を示している可能性も考えられる。HACU を担う CHT1 の調節機構は、いまだ未解明の点が多く、今後の研究が進む中で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はあまり報告がないことから、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。