

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。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、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。

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、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 $[^3\text{H}]\text{ACh}$ 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}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 paraoxon 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 は抑制作用を示した。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、神経刺激に应答する 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。

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_{max} 値が正常動物の約 50%にまで低下したのに対して、MKC-231 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。Km 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 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_{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。[³H]MKC-231 結合試験では、[³H]MKC-231 の特異結合が観察され、Scatchard 解析を行ったところ、Kd 値 4.7×10^{-7} M、Bmax 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} M オーダーの Kd 値を示し、この値は[³H]HC-3 の結合試験で報告される Kd 値と同程度であった。この時、MKC-231 は 10^{-9} M の Kd 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 Kd 値は 10^{-5} M- 10^{-6} 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。

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係している可能性が示唆された。MKC-231 は CHT1 による HACU の活性調節機構の解明やアルツハイマー病での関連解明に役立つツールであることも示された。以上のように、本研究はコリン取り込み機構の解明に貢献し、さらにはアルツハイマー病治療薬開発のストラテジーを示した点で評価され、博士(薬学)の授与に値すると判断された。