

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790398

研究課題名 (和文) 新規ピロリドン誘導体の NMDA 受容体活性化と認知機能改善効果

研究課題名 (英文) Effect of cognitive function mediated by NMDA receptor activation of new nootropic drug.

研究代表者

森口 茂樹 (MORIGUCHI SHIGEKI)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：70374949

研究成果の概要(和文):認知機能調節におけるピロリドン誘導体に関する研究において、申請者は次の報告を行った。ピロリドン誘導体である nefiracetam が NMDA 受容体賦活作用ならびに CaM キナーゼ II 活性化を介して認知機能調節を亢進する(Moriguchi et al., J. Neurochem. 2008)、nefiracetam は神経変性疾患のモデルである嗅球摘出マウスにおいても、CaM キナーゼ II および PKC の活性化を介して認知機能調節を亢進する(Moriguchi et al., J. Neurochem. 2009)、nefiracetam はプレシナプスにおけるニコチン性アセチルコリン受容体を介して、グルタミン酸の遊離を促進する(Moriguchi et al., Neuroscience 2009) およびアルツハイマー病治療薬である galantamine は CaM キナーゼ II の活性化を介して認知機能調節を亢進する(Moriguchi et al., Hippocampus 2009)。

研究成果の概要(英文):In this present study, we demonstrated that nefiracetam mediates cognitive function through activation of CaM kinase II (Moriguchi et al., J. Neurochem. 2008), and nefiracetam augments the impairment of cognitive function through activation of CaM kinase II and PKC in olfactory bulbectomized mice (Moriguchi et al., J. Neurochem. 2009), and nefiracetam enhances glutamatergic system via presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in rat cortical neurons (Moriguchi et al., Neuroscience 2009), and galantamine mediates cognitive function through activation of CaM kinase II (Moriguchi et al., Hippocampus, 2009).

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:境界医学・応用薬理学

キーワード:NMDA 受容体、記憶学習、CaMKII、PKC、アルツハイマー

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に伴いアルツハイマー病患者の増加は深刻な社会問題である。最近の研究によりアルツハイマー病患者の脳内では β -amyloid の凝集、沈着が認められ、神経変性疾患を誘発し、認知機能の低下を引き起こすことが明らかとなってきた。現在、アルツハイマー病治療薬の創薬研究としてアルツハイマー病患者の脳内における β -amyloid の凝集阻害薬、ワクチンの開発が進められているが臨床応用には至っていない。一方、アルツハイマー病患者に認められる進行性の神経変性疾患に注目した研究として、アルツハイマー病患者の脳内においてアセチルコリン神経系の機能低下に着目したアセチルコリン賦活作用をもつ抗コリンエステラーゼ阻害薬が開発され、tacrine、donepezil、rivastigmine、galantamine が認可された。現在、日本では donepezil のみが認可を受けているが、欧米と比較しても遅れを取っている状況である。しかしながら、これらの治療薬の効能は不十分であり悪心、嘔吐、下痢等の副作用が認められ、アルツハイマー病患者の quality of life (QOL) と症状を長期に改善する治療薬は存在していない。

2. 研究の目的

申請者はこれまでピロリドン誘導体である nefiracetam に関する研究を行い、nefiracetam がニコチン性アセチルコリン受容体賦活作用だけでなく、NMDA 受容体賦活作用を有することを報告してきた。Nefiracetam の作用機序はアルツハイマー病患者の進行性の神経変性疾患に有用である可能性は高いが、実際は臨床試験において十分な結果を得るには至らなかった。そこで本研究では、新規ピロリドン誘導体を用いて、アルツハイマー病患者により有用な治療薬の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1). 新規ピロリドン誘導体のNMDA受容体活性の検討

申請者はノースウエスタン大学・医学部の Prof. Toshio Narahashi との共同研究として新規ピロリドン誘導体 (DM832, DM235, HN19) の提供を受けた。本研究では、はじめに新規ピロリドン誘導体における NMDA 受容体グリシン結合部位を標的とした NMDA 受容体賦活作用について電気生理学的手法により解析する。実験にはマウス大脳皮質並びに海馬の初代培養細胞を用いる。この培養技術に関しては、すでに当研究室において確立しており、研究の遂行は容易である。電気生理学的手法として Patch-clamp 法による

細胞内記録法を用いる。薬物適用法として薬物を局所的にかつ迅速に適用できる U-tube 法により NMDA により惹起される電流を測定し、新規ピロリドン誘導体の NMDA 受容体賦活作用について検討する。本研究の標的は、NMDA 受容体グリシン結合部位であるので、NMDA 賦活作用が認められた新規ピロリドン誘導体においてはグリシン結合部位に作用するかどうかをグリシンとの結合実験もしくは NMDA 受容体グリシン結合部位阻害薬である 7-chloro-kynurenic acid (7-ClKN) を用いて検討する。以上の方法により新規ピロリドン誘導体より NMDA 受容体グリシン結合部位に対して賦活作用を有する誘導体を選別する。

(2). NMDA受容体グリシン結合部位活性を有する新規ピロリドン誘導体の脳スライスを用いた海馬CA1領域における長期増強現象(LTP)の測定

Patch-clamp法により得られたNMDA受容体グリシン結合部位活性を持つ新規ピロリドン誘導体は、ラット脳スライスを用いて海馬CA1領域におけるLTPを測定する。LTPは記憶・学習の指標として確立しており、NMDA受容体に依存することは既に明らかとなっている。LTP測定後のスライス切片は海馬CA1領域を切り出し、 -80°C にて凍結保存し、生化学的手法により解析する。

(3). NMDA受容体グリシン結合部位活性を有する新規ピロリドン誘導体における生化学的検討による細胞内情報伝達機構の解明

-80°C にて凍結保存したラット海馬 CA1 領域のスライス切片は、ホモジナイズ、SDS 化後、Western blot 法により電気泳動を行う。当研究室では LTP 誘導には細胞内に局在する CaM キナーゼ II が重要であることを報告している。NMDA 受容体グリシン結合部位活性を有する新規ピロリドン誘導体は NMDA 受容体の下流に存在し、記憶・学習に重要な役割を果たしている CaM キナーゼ II を中心に、protein kinase C、protein kinase A 等の細胞内情報伝達機構について生化学的手法により検討する。

(4). NMDA受容体グリシン結合部位活性を有する新規ピロリドン誘導体における行動薬理学的手法を用いた解析

行動解析として記憶・学習の行動実験法として用いられている passive avoidance 法、novel object recognition 法、Y-maze 法および water maze 法を用いて NMDA 受容体グリシン結合部位に対して賦活作用を有する新規化合物の効

果を in vivo 条件下において検討する。自発運動量測定には open field 法、運動機能測定には rota-rod 法を用いる。

(5). 嗅球摘出モデルマウスを用いた新規ピロリドン誘導体のNMDA賦活作用の検討

嗅球摘出モデルマウスはこれまでの報告により記憶・学習の低下、海馬におけるアセチルコリン神経系の機能低下が明らかとなっている。申請者は最近の研究により嗅球摘出モデルマウスの海馬CA1領域においてアセチルコリン神経系に加えてNMDA受容体機能の低下、CaMKキナーゼII活性の低下を見出した(Moriguchi et al., J. Neurochem. 2006)。この結果、嗅球摘出モデルマウスはアルツハイマー病患者と脳内における神経機能の低下が類似していることが明らかとなった。そこで申請者は嗅球摘出モデルマウスを神経変性疾患のモデルの一つとして、NMDA受容体グリシン結合部位活性を有する新規ピロリドン誘導体の効果について解析する。また、申請者は嗅球摘出モデルマウスの海馬CA1領域でLTPの減弱を明らかとしており、NMDA受容体グリシン結合部位活性を有する新規ピロリドン誘導体により減弱したLTPの回復が認められるかを検討する。LTP測定後のCA1領域を含む脳スライス切片は平成20年度と同様にwestern blot法によりCaMKキナーゼIIに注目し、細胞内カルシウムシグナルへの影響について解析する。嗅球摘出モデルマウスではPassive avoidance 法、novel object recognition法、water maze 法ならびにY-maze法による行動解析により有意な記憶・学習の低下が認められた。新規ピロリドン誘導体のin vivoにおける記憶・学習評価も同様に解析する。

(6). 嗅球摘出モデルマウスを用いた新規ピロリドン誘導体のシナプス応答に関する電気生理学的解析

嗅球摘出モデルマウスにおいて新規ピロリドン誘導体の認知機能への効果が十分に認められた際、脳スライスを用いたpatch-clamp法により細胞内のシナプス応答の解析を行う。NMDA電流ならびにAMPA電流による細胞内情報伝達の解析を通じて、新規ピロリドン誘導体の作用機序の同定を行う。

4. 研究成果

申請者は、アルツハイマー病患者において機能低下が報告されているグルタミン酸機能、特に、NMDA 受容体に着目し、その賦活作用により認知機能の亢進を導く治療法の解明について追究した。その結果、既に米国でアルツハイマー病治療薬として承認を受け、実際に患者に適応されているGalantamineの新しい作用機序として、細胞内でカルシウムと結合し、認知機能の

密接に関与しているカルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM キナーゼ II) の活性化を介した NMDA 受容体賦活作用の亢進を見出した (Moriguchi et al., Hippocampus, 2009)。また、申請者が注目している Nootropics では、Nefiracetam が神経変性疾患のモデルマウスである嗅球摘出マウス(OBX)において機能低下が認められている NMDA 受容体および CaM キナーゼ II 活性に対して (Moriguchi et al., J. Neurochem. 2006)、有意な改善作用を有することを見出した (Moriguchi et al., J. Neurochem. 2009)。さらに、シナプス間隙における Nefiracetam によるグルタミン産産遊離には、ニコチン生アセチルコリン受容体のサブタイプである $\alpha 4 \beta 2$ 型受容体を介して促進することも同様に見出した (Moriguchi et al., Neuroscience, 2009)。本研究の結果により、これまで着目されてこなかった NMDA 受容体賦活作用および CaM キナーゼ II 活性化による新しいアルツハイマー治療法を提唱できたと考えている。今後、この仮説をより実証するために詳細な検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Yui Yamamoto, Norifumi Shioda, Feng Han, Shigeki Moriguchi, Akira Nakajima, Akihito Yokosuka, Yoshihiro Mimaki, Yutaka Sashida, Tohru Yamakuni, Yasushi Ohizumi and Kohji Fukunaga: Nobiletin improves brain ischemia-induced learning and memory deficits through stimulation of CaMKII and CREB phosphorylation. Brain Res. 1295, 218-229 (2009). (査読有り)

2. Shigeki Moriguchi, Feng Han, Norifumi Shioda, Yui Yamamoto, Takeharu Nakajima, Osamu Nakagawasai, Takeshi Tadano, Jay Z Yeh, Toshio Narahashi and Kohji Fukunaga: Nefiracetam activation of CaM kinase II and Protein kinase C mediated by NMDA and metabotropic glutamate receptors in olfactory bulbectomized mice. J. Neurochem. 110, 170-181 (2009). (査読有り)

3. Shigeki Moriguchi, Xilong Zhao, William Marszalec, Jay Z Yeh, Kohji Fukunaga and Toshio Narahashi: Nefiracetam and galantamine modulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission via stimulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in rat cortical neurons. *Neuroscience* 160, 484-491 (2009). (査読有り)

4. Shigeki Moriguchi, Norifumi Shioda, Feng Han, Jay Z Yeh, Toshio Narahashi and Kohji Fukunaga: Galantamine enhancement of long-term potentiation is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C activation. *Hippocampus* 19, 844-854 (2009). (査読有り)

5. Shigeki Moriguchi, Norifumi Shioda, Feng Han, Toshio Narahashi and Kohji Fukunaga: CaM kinase II and protein kinase C activations mediate enhancement of long-term potentiation by nefiracetam in the rat hippocampal CA1 region. *J. Neurochem.* 106, 1092-1103 (2008). (査読有り)

6. Feng Han, Norifumi Shioda, Shigeki Moriguchi, Yui Yamamoto, Alisar Ali Raie, Yoshimasa Yamaguchi, Masataka Hino and Kohji Fukunaga: Spino[imidazo[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one (ZSET1446/ST101) treatment rescues olfactory bulbectomy-induced memory impairment by activating CaM kinase II and protein kinase C in mouse hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 127-134 (2008). (査読有り)

7. Kentaro Matsuzaki, Kenichi Miyazaki, Seiichiro Sakai, Hiromu Yawo, Norihito Nakata, Shigeki Moriguchi, Kohji Fukunaga, Akihito

Yokosuka, Yutaka Sashida, Yoshihiro Mimaki, Tohru Yamakuni and Yasushi Ohizumi: Nobiletin, a citrus flavonoid with neurotrophic action, augments protein kinase A-mediated phosphorylation of the AMPA receptor subunit, GluR1, and the postsynaptic receptor response to glutamate in murine hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 578, 194-200 (2008). (査読有り)

8. Feng Han, Norifumi Shioda, Shigeki Moriguchi, Zheng-Hong Qin and Kohji Fukunaga: Downregulation of glutamate transporters is associated with elevation in extracellular glutamate concentration following rat microsphere embolism. *Neurosci. Lett.* 430, 275-280 (2008). (査読有り)

9. Feng Han, Norifumi Shioda, Shigeki Moriguchi, Zheng-Hong Qin and Kohji Fukunaga: The vanadium (IV) compound rescues septo-hippocampal cholinergic neurons from neurodegeneration in olfactory bulbectomized mice. *Neuroscience* 151, 671-679 (2008). (査読有り)

[学会発表] (計 12 件)

1. 山本由似、塩田倫史、森口茂樹、中島昌、山國徹、大泉康、福永浩司: 脳虚血に伴う学習記憶障害と CaMKII 機能低下との関連性 (東北バイオサイエンス 5/19/2008 仙台)

2. 山本由似、塩田倫史、森口茂樹、中島昌、山國徹、大泉康、福永浩司: 脳虚血に伴う CaMKII 活性低下は学習記憶障害に関与している (第 10 回ブレインサイエンス研究会 5/31-6/1/2008 福岡)

3. 森口茂樹、楢橋敏夫、福永浩司: ラット大脳皮質神経細胞の興奮性および抑制性神経伝達におけるガランタミンならびにネフィラセタムの効果(第31回日本神経科学大会 7/9-11/2008 東京)
4. Fang Han, Norifumi Shioda, Shigeki Moriguchi, Yoshimasa Yamaguchi, Masataka Hino and Kohji Fukunaga :A novel cognitive enhancer rescues olfactory bulbectomy-induced memory impairment through stimulation of CaMKII and PKC signalings in mouse hippocampus. (International Conference on Alzheimer's Disease 7/26-31/2008 Chicago USA)
5. Kohji Fukunaga, Feng Han, Shigeki Moriguchi and Norifumi Shioda :The vanadium (IV) compound ameliorates OBX-induced neurodegeneration of the septo-hippocampal cholinergic neurons through Akt and ERK pathways. (International Conference on Alzheimer's Disease 7/26-31/2008 Chicago USA)
6. Shigeki Moriguchi, Feng Han, Norifumi Shioda, Toshio Narahashi and Kohji Fukunaga : Potentiation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II benefits for cognitive enhancement in Alzheimer's disease patients. (International Conference on Alzheimer's Disease 7/26-31/2008 Chicago USA)
7. 山本由似、塩田倫史、韓峰、森口茂樹、福永浩司:アルツハイマー治療薬ドネペジルはアセチルコリン神経保護作用を有する(霧島フォーラム 8/29-31/2008 大分)
8. 福永浩司 森口茂樹、塩田倫史、山本由似、韓峰:新しい作用機序を有する認知機能改善薬の創薬研究(薬理学サマーセミナー2008 9/8-10/2008 栃木)
9. Shigeki Moriguchi, Feng Han, Satomi Kita, Issei Komuro. Takahiro Iwamoto and Kohji Fukunaga :Impairment of cognitive function via down-regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX2) knock-out mice (第51回日本神経化学会 9/11-13/2008 富山)
10. 山本由似、塩田倫史、韓峰、森口茂樹、福永浩司:嗅球摘出マウスにおけるドネペジルによるアセチルコリン神経保護作用(第59回日本薬理学会北部会、9/12-14/2008、仙台)
11. Yui Yamamoto, Feng Han, Norifumi Shioda, Shigeki Moriguchi and Kohji Fukunaga : A novel cognitive enhancer, ZSET1446 improves olfactory bulbectomy-induced memory impairment through CaMKII and PKC activation in mouse hippocampus. (XI Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine, 9/12-14/2008, Sendai)
12. 山本由似、塩田倫史、韓峰、森口茂樹、福永浩司:嗅球摘出マウスにおけるDonepezilによるアセチルコリン神経保護作用(第47回日本薬学会東北支部大会、10/26/2008、岩手)
- [図書](計0件)
- [産業財産権]
○出願状況(計0件)
○取得状況(計0件)
- [その他]
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

森口 茂樹 (MORIGUCHI SHIGEKI)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号:70374949

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: