

令和元年5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15456

研究課題名(和文) T型カルシウムチャネルによる神経新生調節機構の解明と創薬研究

研究課題名(英文) Drug discovery and neurochemical researches about T-type calcium channel in neurogenesis.

研究代表者

矢吹 悌 (Yabuki, Yasushi)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70756121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本のうつ病患者は現在 100 万人を超える。自殺者の約 60% はうつ病患者であり深刻な社会問題となっている。私達は T 型カルシウムチャネルに着目し、T 型チャネルを賦活化する化合物を創製した。この化合物は嗅球摘出マウスにみられるうつ様行動を改善する。うつ様行動と海馬における神経新生は良く相関するが、T 型チャネル賦活化薬は嗅球摘出マウスの神経新生の障害も改善した。また、この化合物はうつ病に関係するモノアミン遊離も促進した。実際に、T 型チャネルの遺伝子欠損マウスを用いた実験でも神経新生の低下がみられた。以上の結果から、T 型チャネルは神経新生、脳機能の維持に重要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の抗うつ薬はモノアミントランスポーターを阻害し、セロトニンやノルアドレナリンなどのモノアミンを増加させることで抗うつ効果を示す。しかしながら、抗うつ効果が得られるまでに時間がかかること、治療抵抗性うつ病患者の増加していることから新規作用機序の治療薬開発が求められている。また、T 型カルシウムチャネル賦活化薬の開発は世界初であり、研究のオリジナル性および独創性は極めて高いと考えられる。さらに、T 型カルシウムチャネルの脳高次機能については未だ不明な点が多く、神経新生やうつ病との関連が明らかになれば神経科学の発展と新規抗うつ薬の開発に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Number of depressive patients is over million in Japan, and it is serious social problem that depressive patients may account for 60% of suicides. We succeeded to develop T-type calcium channel enhancer. This compound improved depressive-like behaviors in olfactory-bulbectomized (OBX) mice. Whereas depressive-like behaviors are closely associated with hippocampal adult neurogenesis, T-type calcium channel enhancer could restore impaired hippocampal neurogenesis in OBX mice. In addition, T-type calcium channel enhancer enhanced monoamine releases in the mouse hippocampus, which have important role in depression. Finally, we observed impaired neurogenesis in the T-type calcium channel gene knock out mouse hippocampus. Taken together, we suggest that T-type calcium channel may have an important role in adult neurogenesis and brain homeostasis.

研究分野：神経薬理学

キーワード：T 型カルシウムチャネル 神経新生

1. 研究開始当初の背景

我が国におけるうつ病患者は年々増加しており、現在 100 万人を超えている。自殺者の約 60% はうつ病患者といわれており、深刻な問題となっている。うつ病は耐え難いストレスなどが引き金となり発症する精神疾患であるが、詳細な発症メカニズムは解明されていない。抗うつ作用を持つイミプラミンがモノアミン系に作用するという発見から、既存の抗うつ薬はセロトニンやノルアドレナリンを標的としている。しかしながら、十分な改善効果が得られない難治性うつ病患者が増加しており、新規作用機序の抗うつ薬の開発が望まれている。

多くの抗うつ薬は海馬歯状回における神経新生を促進するが、X 線照射により神経新生を阻害すると抗うつ効果が消去されることから、神経新生とうつ病との関連が示唆されている (Santarelli L et al., 2003. Science. 301(5634):805-809.)。私達は、アミロイド 注入ラット海馬においてアセチルコリン (ACh) 遊離を促進し、認知機能障害を改善する ST101 の開発に携わってきた (Yamaguchi Y et al., 2006. J Pharmacol Exp Ther. 317(3):1079-1087.)。ST101 は T 型カルシウムチャンネルを活性化し、記憶獲得に必須のプロテインキナーゼであるカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼ II (CaMKII) 活性を亢進し、OBX マウスの記憶障害を改善する (Moriguchi S et al., 2012. J Neurochem. 121:44-53.)。さらに、**ST101 は OBX マウスの海馬歯状回において低下した神経新生を促進し、抗うつ作用を示す (Shioda N et al., 2010. J Pharmacol Exp Ther. 333(1):43-50.)**。新規抗うつ薬を開発する上で、T 型カルシウムチャンネル活性化と抗うつ作用が相関することは重要である。ST101 は米国にてアルツハイマー病患者を対象に第 II 相試験が行われたが、ドネペジル併用投与により相乗効果が認められた (Gauthier S et al., 2015. J Alzheimers Dis. 48(2):473-481.)。

私達はより活性の強い化合物を得るために ST101 を軸に、スピロイミダゾピリジン骨格を持つ構造誘導体 SAK 化合物を作製した。申請者は ST101 より作用の強い化合物を同定するために以下の実験を行った。1) 急性ラット海馬スライスを作製し、ST101 (100 pM) および SAK 化合物 (100 pM) を 40 分間処置し、CaMKII 活性および海馬長期増強 (LTP) を測定する実験系を確立した。2) Cav3.1、3.2、3.3 それぞれを過剰発現したマウス由来神経芽細胞 neuro2A 細胞を用い、ホールセルパッチクランプ法による T 型カルシウムチャンネル電流測定系を確立した。3) in vivo マイクロダイアリシス法を用いた神経伝達物質の測定系を確立した (Yabuki Y et al., 2014. Neuroscience. 259:126-141.; Yabuki Y et al., 2013. Brain Res. 1520:157-167.)。4) OBX マウスを作製し、行動薬理試験による記憶学習障害の評価系を確立した (Yabuki Y et al., 2015. Brain Res. 1622:102-113.; Moriguchi S and Yabuki Y et al., 2016. Molecular Psychiatry. In press.)。これらの研究成果から、ST101 よりも活性が高い SAK3 を見出した (PCT/JP2013/51388: Yabuki et al., 2017. Neuropharmacology.)。SAK3 は T 型カルシウムチャンネル活性化作用、グルタミン酸 (Glu) や ACh といった神経伝達物質遊離促進作用および記憶・学習障害改善効果の全てが ST101 より強力であり、新規認知機能改善薬として期待できる。

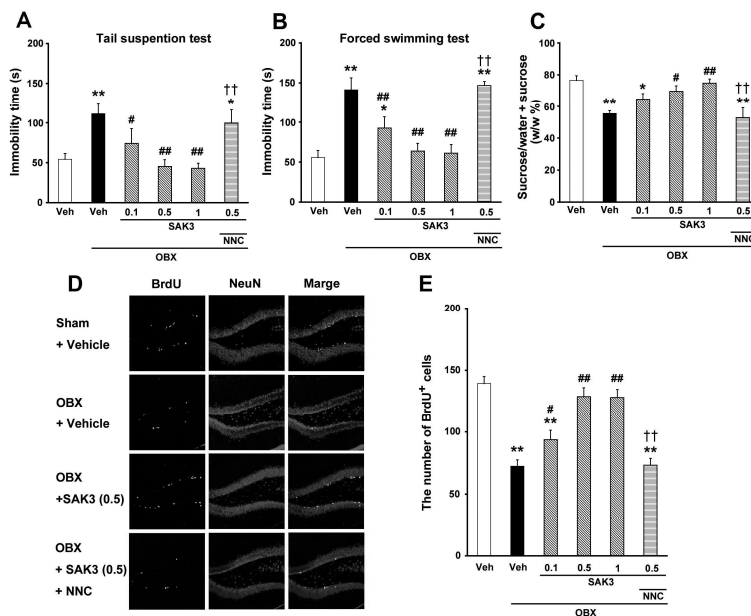


図 1 SAK3 の OBX マウスに対する抗うつ効果 (A-C) と神経新生促進効果 (D, E)

(A-C) 懸垂尾試験による SAK3 の抗うつ効果 (A)。強制水泳試験による SAK3 の抗うつ効果 (B)。スクロース嗜好試験による SAK3 の抗うつ効果 (C)。(D) 新生細胞の増殖能を亢進する。(E) SAK3 投与により新生細胞が保護される。SAK3 の改善効果は T 型カルシウムチャンネル阻害薬により抑制される。

Xu J and Yabuki Y et al., 2018. J Pharmacol Sci. 137(4):333-341.

より改変

NNC, NNC 55-0396 (12.5 mg/kg, i.p.) 投与 * p<0.05 vs. control,

** p<0.01 vs. control, # p<0.05 vs. OBX, ## p<0.01 vs. OBX

2. 研究の目的

本研究では、海馬歯状回神経新生における T 型カルシウムチャンネルの役割とうつ様行動との関連について解

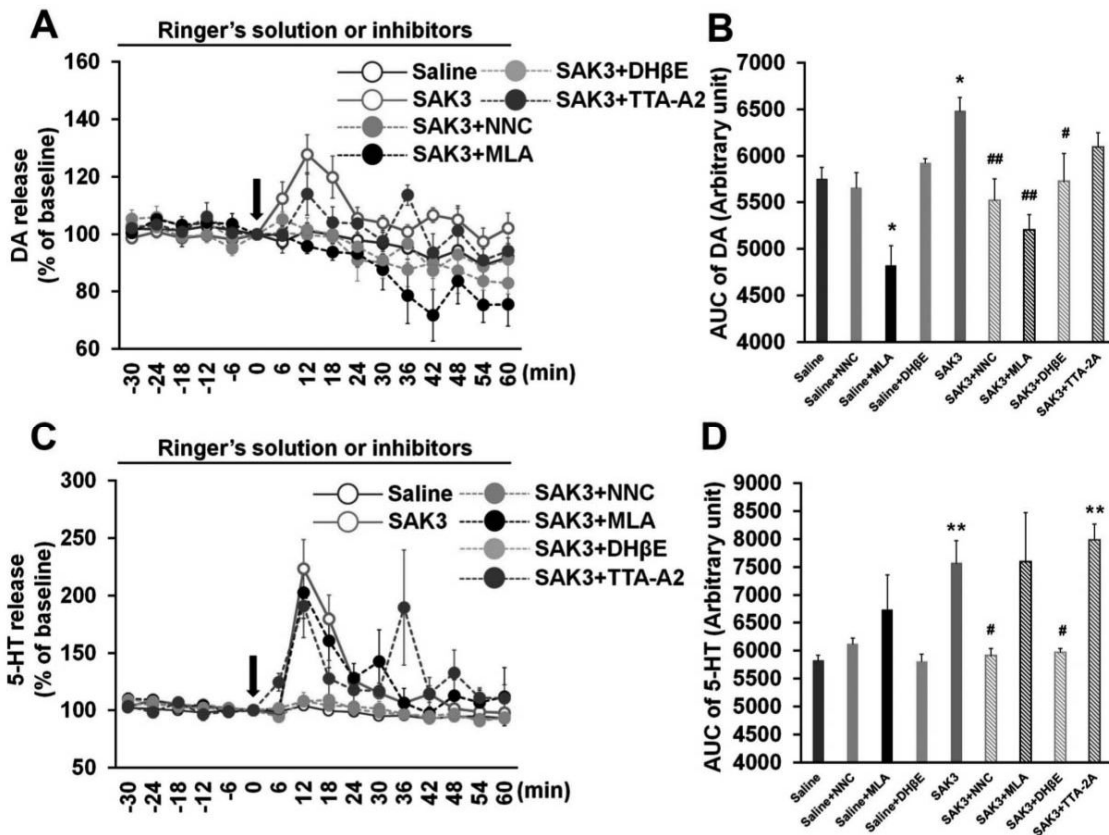


図2 海馬における SAK3 によるモノアミン遊離促進作用と阻害薬による作用機序の検討

(A, C) SAK3 投与によるドパミン (A) ・セロトニン (C) 遊離促進作用と阻害薬による抑制効果を検討した時間経過を示している。(B, D) ドパミン (A) および セロトニン (C) 遊離量を面積で定量した。SAK3 投与によりドパミン・セロトニン遊離が促進し、その作用は T 型カルシウムチャネル阻害薬 NNC 55-0396 処置により拮抗される。nAChR 阻害薬処置によってもモノアミン遊離が抑制されることから、SAK3 は ACh 遊離促進を介してもモノアミン遊離を促進すると考えられる。

Wang S and Yabuki Y et al., 2018. PLoS One. 13(12):e0206986.より改変

SAK3, SAK3 (0.5 mg/kg, p.o.) 投与; NNC, NNC 55-0396 (1 μM); MLA, methyllycaconitine (1 nM); Dh E, Dihydro-erythroidine (100 μM); TTA-A2 (1 μM)

* p<0.05, ** p<0.01 vs. Saline, # p<0.05, ## p<0.01 vs. SAK3,

明する。また、難治性うつ病モデル動物に対する SAK3 の抗うつ効果を解析する。初めに、1) OBX マウスのうつ様行動に対する SAK3 の改善作用と神経新生促進作用について T 型カルシウムチャネル阻害薬を用い検討した。T 型カルシウムチャネルの生理機能解析のために必要な Cav3.1 欠損マウスは崎村健司教授 (新潟大学脳研究所基礎神経科学部門細胞神経生物学分野) より導入済みである (Hildebrand ME et al., 2009. J Neurosci. 29(31):9668-9682.)。Cav3.1 欠損マウスを用い、2) 海馬歯状回における新生細胞の増殖・生存能を評価し、神経新生における役割を生化学的手法により解析する。海馬歯状回における細胞内情報伝達機構および神経可塑性を生化学的および電気生理学的手法により解析する。3) 行動薬理試験により Cav3.1 欠損マウスのうつ様行動を評価する。一方、SAK3 の抗うつ効果の検討には既存の抗うつ薬に耐性を示すストレスホルモン投与マウスを用いる。4) ストレスホルモン投与マウスに対し、SAK3 急性および慢性投与による抗うつ効果を行動薬理試験により評価する。5) 抗うつ効果の作用機序を in vivo マイクロダイアリス法、生化学的手法および電気生理学的手法を用い多角的に検討する。

3. 研究の方法

1) OBX マウスのうつ様行動と神経新生障害に対する SAK3 改善作用の検討

嗅球摘出 2 週目から SAK3 (0.1, 0.5 or 1.0 mg/kg, p.o.) を 1 日 1 回 2 週間投与し、尾懸垂試験、強制水泳試験およびショ糖試験によりうつ様行動を評価した。同時に、BrdU (50 mg/kg, i.p.) を投与し、海馬歯状回における新生細胞数を評価した。免疫プロット法を用い細胞内情報伝達を検討した。また、無処置マウスに SAK3 (0.5 mg/kg, p.o.) と BrdU (50 mg/kg, i.p.) を投与し、新生細胞の細胞増殖・生存における SAK3 の作用を検討した。T 型カルシウ

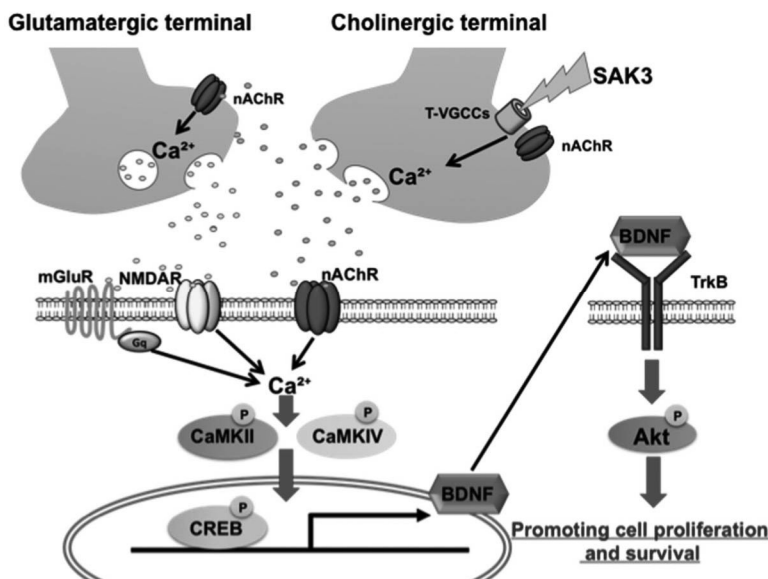


図 3 SAK3 の T 型カルシウムチャンネル賦活化による海馬神経新生促進作用のメカニズム

SAK3 投与により、T 型カルシウムチャンネルが賦活化することで海馬における ACh の遊離が促進される。その結果、グルタミン酸やモノアミン遊離が促進され、シナプス後部への情報伝達が活性化される。その後、CaMKII や CaMKIV といったキナーゼの活性化を介し、BDNF 産生が上昇することで神経新生が亢進されると考えられる。

Xu J and Yabuki Y et al., 2018. J Pharmacol Sci. 137(4):333-341. より改変

ACh, アセチルコリン; Akt, protein kinase B; BDNF, 脳由来栄養因子; CaMKII, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; CaMKIV, calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV; Glu, グルタミン酸; T-type VGCC, T 型カルシウムチャンネル

GABA 遊離促進作用を検討した。さらに、海馬急性スライスを作製し、自発的興奮性後シナプス電流 (sEPSC) を測定した。

4. 研究成果

1) OBX マウスのうつ様行動と神経新生障害に対する SAK3 改善作用の検討

OBX マウスでは尾懸垂試験および強制水泳試験における無動時間の上昇、およびショ糖嗜好試験において、ショ糖に対する嗜好性が低下していることからうつ様行動を呈している (図 1 A-C)。SAK3 (0.5 and 1.0 mg/kg, p.o.) 投与により OBX マウスのうつ様行動が改善した (図 1 A-C)。うつ様行動の改善と良く相関し、OBX マウス海馬歯状回で低下した神経新生が SAK3 (0.5 mg/kg, p.o.) 投与により改善した (図 1D, E)。細胞内情報伝達機構を検討したところ、SAK3 (0.5 mg/kg, p.o.) は OBX マウス海馬歯状回で低下していた CaMKII および CaMKIV リン酸化反応を改善し、CREB リン酸化反応を亢進した。結果、神経新生に重要な機能を果たしている脳由来栄養因子 (BDNF) - Akt シグナルが活性化した。実際に、SAK3 (0.5 mg/kg, p.o.) は無処置マウス海馬歯状回において新生細胞の細胞増殖・生存能を亢進した。さらに、SAK3 (0.5 mg/kg, p.o.) の OBX マウスに対する改善作用は T 型カルシウムチャンネル阻害薬である NNC 55-0396 (12.5 mg/kg, i.p.) 投与により拮抗された。以上の結果は、SAK3 は T 型カルシウムチャンネル賦活化を介し、海馬神経新生を亢進することで OBX マウスにみられるような疾患由来のうつ様行動に対し改善作用を示したと考えられる (図 3)。

2) Cav3.1 欠損マウスにおける海馬神経新生の評価

Cav3.1 T 型カルシウムチャンネル欠損マウス海馬歯状回において神経新生が低下していることを見出した。また、Cav3.1 T-型カルシウムチャンネル欠損マウスでは 新生細胞の増殖および生存能どちらも低下していた。Cav3.1 の海馬歯状回における局在について検討したところ、神

ムチャンネル阻害薬には NNC55-0396 (12.5 mg/kg, i.p.) を用いた。

2) Cav3.1 欠損マウスにおける海馬神経新生の評価

野生型および Cav3.1 欠損マウスに BrdU (50 mg/kg, i.p.) を投与し、海馬歯状回における新生細胞数を定量し、新生細胞の増殖・生存能を免疫組織化学染色法により評価した。細胞増殖・生存および神経分化に關与する細胞内情報伝達機構を免疫プロット法により解析した。

3) Cav3.1 欠損マウスにおけるうつ様行動の評価

8 週齢の野生型および Cav3.1 欠損マウスを用い、強制水泳試験および尾懸垂試験により、うつ様行動を評価した。

4) ストレスホルモン投与マウスに対する SAK3 の改善作用の検討

ストレスホルモンを 21 日間慢性投与し、モデルマウスを作製する。ST101 または SAK3 を急性および 2 週間慢性投与し、抗うつ作用を行動薬理試験により確認し、免疫プロット法により細胞内情報伝達機構を評価する。

5) SAK3 の神経伝達物質遊離促進作用の評価

In vivo マイクロダイアリシス法により、SAK3 投与によるモノアミン(ノルアドレナリン、ドパミン、セロトニン)およびグルタミン酸・

経幹細胞のマーカーである nestin および 未成熟細胞のマーカーである DCX と共局在を示した。これらのことは Cav3.1 から流入するカルシウムイオンが神経新生に直接影響を与えている可能性がある。実際に細胞増殖・生存に重要なプロテインキナーゼである Akt リン酸化反応は低下していた。

3) Cav3.1 欠損マウスにおけるうつ様行動の評価

うつ様行動を懸垂尾試験および強制水泳試験を用い評価したところ、Cav3.1 欠損マウスではうつ様行動はみられなかった。一方、海馬歯状回の脆弱性と相関が見られる社会性行動が Cav3.1 欠損マウスでは低下していた。Cav3.1 欠損マウスと野生型マウスでは行動量に変化はみられなかった。

4) ストレスホルモン投与マウスに対する SAK3 の改善作用の検討

ストレスホルモンを 21 日間投与したうつ様モデルマウスに対する ST101 および SAK3 の作用を検討したところ、改善効果はみられなかった。現在、例数の追加と再現性について検討している。また、ストレスホルモンを Cav3.1 欠損マウスに投与し、同様にうつ様行動について評価している。

5) SAK3 の神経伝達物質遊離促進作用の評価

T 型カルシウムチャネル賦活薬 SAK3 投与により、海馬におけるドパミン・セロトニン遊離が促進した。一方、SAK3 はノルアドレナリン遊離および前頭前皮質内側部におけるドパミン・セロトニン遊離には影響を与えなかった。SAK3 の作用は T 型カルシウムチャネル阻害薬 NNC 55-0396 (1 μ M) 処置により抑制された。SAK3 は ACh 遊離を促進するが、ドパミン・セロトニン遊離促進作用はニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) 拮抗薬である methyllycaconitine (MLA: 1 nM) または Dihydro- α -erythroidine (Dh E: 100 μ M) でも阻害された (図 2)。故に、SAK3 は T 型カルシウムチャネルを賦活化し、ACh 遊離を促進することで海馬におけるドパミン・セロトニン遊離を促進すると考えられる。加えて、SAK3 はグルタミン酸および GABA 遊離にも影響を与えることがわかった。また、sEPSC の測定系を立ち上げることが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1) Wang S., **Yabuki Y. (equal contribution)**, Matsuo K., Xu J., Izumi H., Sakimura K., Saito T., Saido T.C. and Fukunaga K. (2018) T-type calcium channel enhancer SAK3 promotes dopamine and serotonin releases in the hippocampus in naive and amyloid precursor protein knock-in mice. *PLoS One*. 13(12):e0206986. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0206986.
- 2) Xu J., **Yabuki Y. (equal contribution)**, Yu M., and Fukunaga K. (2018) T-type calcium channel enhancer SAK3 produces anti-depressant-like effects by promoting adult hippocampal neurogenesis in olfactory bulbectomized mice. *J Pharmacol Sci*. 137(4):333-341. 査読有 doi: 10.1016/j.jphs.2018.07.006.
- 3) Husain N., **Yabuki Y.**, Shinoda Y., Fukunaga K. (2018) Acute Treatment with T-Type Calcium Channel Enhancer SAK3 Reduces Cognitive Impairments Caused by Methimazole-Induced Hypothyroidism Via Activation of Cholinergic Signaling. *Pharmacology*. 101(5-6):309-321. 査読有 doi: 10.1159/000488083.
- 4) Izumi H., Shinoda Y., Saito T., Saido T.C., Sato K., **Yabuki Y.**, Matsumoto Y., Kanemitsu Y., Tomioka Y., Abolhassani N., Nakabeppu Y., Fukunaga K. (2018) The Disease-modifying Drug Candidate, SAK3 Improves Cognitive Impairment and Inhibits Amyloid beta Deposition in App Knock-in Mice. *Neuroscience*. 377:87-97. 査読有 doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.02.031.
- 5) **Yabuki Y.**, Jing X. and Fukunaga K. (2017) The T-type calcium channel enhancer SAK3 inhibits neuronal death following transient brain ischemia via nicotinic acetylcholine receptor stimulation. *Neurochem Int*. 108:272-281. 査読有 doi: 10.1016/j.neuint.2017.04.015.

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) **矢吹 悌**、松尾 和哉、若森 実、福永 浩司、脳における T 型カルシウムチャネル機能の解明を目指して、第 18 回ブレインサイエンス研究会 (2017)
- 2) 于 夢澤、許 晶、**矢吹 悌**、福永 浩司、T 型カルシウムチャネル賦活薬 SAK3 による神経新生促進作用、第 68 回 日本薬理学会北部会 (2017)
- 3) **矢吹 悌**、福永 浩司、T 型カルシウムチャネルの神経薬理学的研究、生体機能と創薬シンポジウム 2017 (招待講演) (2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：許 晶

ローマ字氏名：Jing Xu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。