

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590653

研究課題名(和文) T型電位依存性カルシウムチャネル賦活化を標的としたアルツハイマー病創薬研究

研究課題名(英文) Drug discovery study of Alzheimer's disease target for T-type calcium channel activation

研究代表者

森口 茂樹 (Moriguchi, Shigeki)

東北大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：70374949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、認知機能改善薬であるST101のT型カルシウムチャネル賦活作用に注目したアルツハイマー病創薬研究に従事し、海馬におけるST101のT型カルシウムチャネル賦活作用には、AChの遊離促進が関与していることを明らかにした。ST101(1mg/kg)の慢性適応により、嗅球摘出マウス(OBXマウス)における認知機能障害は、有意な改善効果を示し、T型カルシウムチャネル阻害薬であるmibefradil(1mg/kg)の前処置によりこの改善作用は阻害された。また、ST101による認知機能改善作用は、CaMKII α 、PKCおよびERKのリン酸化反応の促進効果が関与していることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel cognitive enhancer, ST101 that activates T-type voltage-gated calcium channels (VGCCs). Here, we address whether T-type VGCC activation with ST101 mediates its cognitive effects in vivo and the relevance of T-type VGCC activation to acetylcholine release in the hippocampus. Acute administration of ST101 at 1 mg/kg, i.p. improved memory-related behaviors in olfactory bulbectomized (OBX) mice. Effects of ST101 administration were abolished by pre-administration of the T-type VGCC inhibitor mibefradil. As expected, significantly reduced CaMKII, PKC, and ERK phosphorylation was restored by acute ST101 administration in the OBX mouse hippocampal CA1 region. Enhancement of CaMKII and PKC but not ERK phosphorylation was inhibited by mibefradil. Taken together, stimulation of T-type VGCCs is critical for the enhanced hippocampal ACh release and improved cognitive function seen following ST101 administration.

研究分野：薬理学、電気生理学

キーワード：ST101 T-type VGCCs CaMKII OBX mice

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 (AD) 患者の増加は深刻な社会問題である。最近の研究により AD 患者の脳内では β -amyloid の凝集、沈着が進行性神経変性疾患を惹起し、認知機能障害を誘発することが明らかになった。現在、創薬研究として AD 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、進行性神経変性疾患に注目した研究として、アセチルコリン (ACh) 神経系の機能低下に注目した ACh の賦活化作用をもつコリンエステラーゼ阻害薬が開発され、tacrine、donepezil、rivastigmine および galantamine が承認を受けた。また、神経細胞保護作用に注目した NMDA 受容体阻害薬である memantine も同様に承認を受けた。日本では今年に入り rivastigmine、galantamine および memantine が新たに承認を受けたが、長年、donepezil のみが利用可能な状況が続き、欧米に遅れを取っている状況である。しかし、これらの治療薬の効能は十分ではなく、悪心、嘔吐、下痢等の副作用も認められ、AD 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

アルツハイマー病治療候補薬である ST101/ZSET1446 は、北米で治験中 (Phase II) の化合物であり、T 型電位依存性カルシウムチャネル (T-type VGCC) の賦活化を介して認知機能調節に必須の分子である CaM キナーゼ II を活性化し、認知機能を改善する。しかしながら、T-type VGCC は $Ca_v3.1$ 、 $Ca_v3.2$ および $Ca_v3.3$ の 3 種類のアイソフォームが脳内に局在するが、ST101 の作用部位は同定できていない。本研究では、 $Ca_v3.1$ 、 $Ca_v3.2$ および $Ca_v3.3$ 過剰発現 Neuro2A 細胞を用いて Whole-cell

patch-clamp 法により T-type VGCC 電流を記録し、さらに、カルシウムイメージング法により細胞内カルシウム濃度を測定し、ST101 の作用部位を同定する。また、認知機能障害モデルマウスを用いて T-type VGCC を介した認知機能改善効果について検討する。

3. 研究の方法

(1) OBX マウスを用いた神経変性疾患モデルにおける ST101 の認知機能改善効果と T-type VGCC 阻害薬 Mibefradil および NNC55-0396 処置の記憶学習行動の検討

申請者は OBX マウスの海馬においてコリン神経系および NMDA 受容体の機能低下、CaM キナーゼ II の自己リン酸化の低下を報告し (Moriguchi et al., J. Neurochem. 2006) OBX マウスの神経系の脱落が AD 患者の神経変性疾患に非常に類似することを報告した。また、OBX マウスでは ST101 処置により有意な認知機能の改善効果が認められることを報告した (Han and Moriguchi et al., J. Pharmacol. Exp. Ther 2008)。そこで、本研究では OBX マウスを用いて OBX マウスにおける ST101 処置の認知機能改善効果が T-type VGCC 阻害薬である Mibefradil および NNC55-0396 により阻害されるかについて記憶学習行動を検討する。具体的には、記憶学習行動の行動解析法として、Y-maze task、Novel object recognition task、Passive avoidance task、Barns maze task を用いる。

(2) OBX マウスの海馬における ACh 遊離に対する ST101 の効果ならびに T-type VGCC 阻害薬 Mibefradil および NNC55-0396 の阻害効果の検討

これまでの報告により、ST101 は β -amyloid 処置ラットの海馬においてニコチン刺激による ACh 遊離を促進すること

(Yamaguchi et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2006) が報告されており、本研究ではマイクロダイアリシス法を用いて、OBX マウスの海馬における ACh 遊離に対する ST101 の効果および T-type VGCC 阻害薬である Mibefradil および NNC55-0396 の阻害効果について検討する。

(3) OBX マウスの海馬における長期増強現象に対する T-type VGCC 阻害薬 Mibefradil および NNC55-0396 の阻害効果の検討

申請者は、OBX マウスの海馬 CA1 領域において長期増強現象 (long-term potentiation: LTP) の減弱が認められること、ST101 処置により LTP の減弱が回復することを報告した (Moriguchi et al., J. Neurochem. 2006; Han and Moriguchi et al., J. Pharmacol. Exp. Ther 2008)。本研究では、ST101 による LTP 回復後の T-type VGCC 阻害薬である Mibefradil および NNC55-0396 の阻害効果について電気生理学的手法を用いて検討する。

(4) OBX マウスの ST101 処置後もしくは T-type VGCC 阻害薬 Mibefradil および NNC55-0396 処置後における海馬神経細胞の細胞内情報伝達機構の解明

電気生理学的手法により解析した海馬のスライス切片は、ホモジナイズ後、Western blot 法により電気泳動を行う。使用する抗体として、自己リン酸化 CaM キナーゼ II、リン酸化 CaM キナーゼ IV などの細胞内キナーゼに注目し、生化学的手法を用いて解析する。

(5) CaM キナーゼ II および CaM キナーゼ IV 欠損マウスを用いた ST101 による認知機能改善効果と T-type VGCC 阻害薬 Mibefradil および NNC55-0396 の阻害効果の検討

CaM キナーゼ II (Fukunaga et al., J. Biol. Chem. 1992) および CaM キナーゼ IV

(Kasahara et al., J. Biol. Chem. 2001) は認知機能調節に必須の分子であり、ST101 は CaM キナーゼ II の活性化を誘導し認知機能改善効果を示す (Han and Moriguchi et al., J. Pharmacol. Exp. Ther 2008)。そこで、申請者は CaM キナーゼ II 欠損マウスを用いて、ST101 の認知機能改善効果と CaM キナーゼ II との関連性について詳細に検討する。また、対象として CaM キナーゼ IV 欠損マウスを用いる。解析法は、上述した行動解析、電気生理学的解析、生化学的手法を用いる。

上述した解析手法により ST101 の細胞内機序として T-type VGCC の重要性について検討を行うが、本研究は (1) Cav3.1、Cav3.2 および Cav3.3 チャンネルの過剰発現 Neuro2A 細胞を用いた研究、(2) OBX マウスを用いた研究、(3) CaM キナーゼ II もしくは IV 欠損マウスを用いた研究の 3 段階より構成されており、研究の進行状態に対応して多角的もしくは多方面より解析することが可能である。

以上の研究により、ST101 による T-type VGCC に注目した新しい AD 創薬研究を行う。

4 . 研究成果

我々は、認知機能改善薬である ST101 の T 型カルシウムチャンネル賦活作用に注目したアルツハイマー病創薬研究に従事し、海馬における ST101 の T 型カルシウムチャンネル賦活作用には、ACh の遊離促進が関与していることを明らかにした。ST101 (1mg/kg) の慢性適応により、嗅球摘出マウス (OBX マウス) における認知機能障害は、有意な改善効果を示し、T 型カルシウムチャンネル阻害薬である mebefradil (1mg/kg) の前処置によりこの改善作用は阻害された。また、ST101 による認知機能改善作用は、CaMKIIalpha, PKC および ERK のリン酸化反応の促進効果が関与していることも明らかにした。本研究により、ST101

の in vivo における T 型カルシウムチャネルを介した認知機能調節のメカニズムについて明らかにした。

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 12 件)

Muhammad Rashedul Islam, Shigeki Moriguchi, Hideaki Tagashira and Kohji Fukunaga: Rivastigmine restores 5-HT_{1A} receptor levels in the hippocampus of olfactory bulbectomized mice. *Advances in Alzheimer's disease* 3, 128-136 (2014) DOI: 10.4236/aad.2014.33012 査読有り

Muhammad Rashedul Islam, Shigeki Moriguchi, Hideaki Tagashira and Kohji Fukunaga: Rivastigmine improves hippocampal neurogenesis and depressive-like behaviors via 5-HT_{1A} receptor stimulation in olfactory bulbectomized mice. *Neuroscience* 272, 116-130 (2014) doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.046. 査読有り

Shigeki Moriguchi, Hideaki Tagashira, Yuzuru Sasaki, Jay Z. Yeh, Hiroyuki Sakagami, Toshio Narahashi and Kohji Fukunaga: CaMKII activity is essential for improvement of memory-related behaviors by chronic rivastigmine treatment. *J. Neurochem.* 128, 927-937 (2014) doi: 10.1007/s12035-014-8737-2. 査読有り

Yun Tian, Yasushi Yabuki, Shigeki Moriguchi, Kohji Fukunaga, Pei-Jiang Mao, Ling-Juan Hong, Ying-Mei Lu, Rui Wang, Muhammad Masood Ahmed, Mei-Hua Liao, Ji-Yun Huang, Rui-Ting Zhang, Tian-Yi Zhou, Sen Long and Feng Han: Melatonin reverses the decreases in hippocampal protein serine/threonine kinases observed in an animal model of autism. *J. Pineal Res.* 56, 1-11 (2014) doi: 10.1111/jpi.12081. 査読有り

Shigeki Moriguchi, Tomoya Tanaka, Toshio Narahashi and Kohji Fukunaga: Novel nootropic drug sunifiram enhances hippocampal synaptic

efficacy via glycine binding site of N-methyl-D-aspartate receptor. *Hippocampus* 23, 942-951 (2013) doi: 10.1002/hipo.22150 査読有り

Shigeki Moriguchi, Yasuharu Shinoda, Yui Yamamoto, Yuzuru Sasaki, Kosuke Miyajima, Hideaki Tagashira and Kohji Fukunaga: Stimulation of the sigma-1 receptor by DHEA enhances synaptic efficacy and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of olfactory bulbectomized mice. *PLoS One* 8, e60863 (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0060863. 査読有り

Yui Yamamoto, Norifumi Shioda, Feng Han, Shigeki Moriguchi and Kohji Fukunaga: A novel cognitive enhancer, ST101, enhances acetylcholine release in mouse dorsal hippocampus through T-type voltage-gated calcium channel stimulation. *J. Pharmacol. Sci.* 121, 212-226 (2013) https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/121/3/121_12233FP/_pdf 査読有り

Shigeki Moriguchi, Tomoya Tanaka, Hideaki Tagashira, Toshio Narahashi and Kohji Fukunaga: Novel nootropic drug sunifiram improves cognitive deficits via CaM kinase II and protein kinase C activation in olfactory bulbectomized mice. *Behav. Brain Res.* 242, 150-157 (2013) doi: 10.1016/j.bbr.2012.12.054. 査読有り

Yasushi Yabuki, Osamu Nakagawasai, Shigeki Moriguchi, Norifumi Shioda, Hiroshi Onogi, Koichi Tan-No, Takeshi Tadano and Kohji Fukunaga: Decreased CaMKII and PKC activities in specific brain regions are associated with cognitive impairment in neonatal ventral hippocampus-lesioned rats. *Neuroscience* 234, 103-115 (2013) doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.048. 査読有り

Shigeki Moriguchi, Norifumi Shioda, Yui Yamamoto, Hideaki Tagashira and Kohji Fukunaga: The T-type voltage-gated calcium channel as a molecular target of the novel

cognitive enhancer ST101: Enhancement of long-term potentiation and CaMKII autophosphorylation in rat cortical slices. J. Neurochem. 121, 44-53 (2012) doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07667.x. 査読有り

Shigeki Moriguchi, Yasushi Yabuki and Kohji Fukunaga: Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired cognitive function in MPTP-treated mice. J. Neurochem. 120, 541-551 (2012) doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07608.x. 査読有り

Norifumi Shioda, Shigeki Moriguchi, Takeshi Oya, Yoko Ishii, Jie Shen, Takako Matsushima, Hisao Nishijo, Masakiyo Sasahara and Kohji Fukunaga: Aberrant hippocampal spine morphology and impaired memory formation in neuronal platelet-derived growth factor beta-receptor lacking mice. Hippocampus 22, 1371-1378 (2012) doi: 10.1002/hipo.20973. 査読有り

[学会発表](計 19件)

アルツハイマー病における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の機能障害

森口茂樹、喜多紗斗美、深谷昌弘、阪上洋行、岩本隆宏、福永浩司 (第16回応用薬理シンポジウム 12/5-6/2014 松島)

アルツハイマー病モデルマウスにおいて発現低下している2型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の機能解明

森口茂樹、喜多紗斗美、岩本隆宏、福永浩司 (第44回日本神経精神薬理学会年会 11/20-22/2014 名古屋)

アルツハイマー病における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の制御機構

森口茂樹 (第57回日本神経化学学会大会(シンポジウム) 9/29-10/1/2014 奈良)

アルツハイマー病モデルマウスにおける

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の機能障害

森口茂樹、喜多紗斗美、深谷昌弘、阪上洋行、岩本隆宏、福永浩司 (第65回日本薬理学会北部会 9/26-27/2014 福島)

アルツハイマー病における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の役割

森口茂樹、喜多紗斗美、岩本隆宏、福永浩司 (第87回日本薬理学会年会 3/19-21/2014 仙台)

アルツハイマー病における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の役割

森口茂樹 (第4回福岡薬理・生理系研究会 12/12/2013 福岡)

Stimulation of sigma-1 receptor improves depressive-like behaviors in CaMKIV null mice.

Shigeki Moriguchi, Yuzuru Sasaki, Hiroyuki Sakagami and Kohji Fukunaga (Neuroscience 2013 (43th. Society for Neuroscience) 11/9-13/2013 San Diego USA)

Sigma-1 受容体活性化による CaMKIV 欠損マウスにおけるうつ様症状の改善効果

森口茂樹、佐々木譲、阪上洋行、福永浩司 (第43回日本神経精神薬理学会年会 10/24-26/2013 沖縄)

Sigma-1 受容体の賦活化による CaMKIV 欠損マウスにおけるうつ様行動の改善効果

森口茂樹、佐々木譲、阪上洋行、福永浩司 (第15回応用薬理シンポジウム 9/28-29/2013 東京)

海馬歯状回における DHEA による sigma-1 受容体の賦活化による神経新生促進作用と抗うつ効果

森口茂樹、佐々木譲、田頭秀章、福永浩司 (第64回日本薬理学会北部会 9/13/2013 旭川)

Methamphetamine causes aberrant behavioral sensitization in junctophilin deficient mice.

森口茂樹、西美幸、竹島浩、福永浩司 (包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ 8/29-9/1/2013 名古屋)

ジャンクトフィリン欠損マウスにおけるメタンフェタミン誘発行動逆耐性の形成異常

森口茂樹、西美幸、竹島浩、福永浩司 (第56回日本神経化学学会大会 (Neuro2013))

6/20-23/2013 京都)

海馬歯状回における DHEA による sigma-1 受容体の賦活化と抗うつ作用

森口茂樹、山本由似、佐々木譲、宮嶋晃輔、田頭秀章、福永浩司 (第 86 回日本薬理学会年会 3/21-23/2013 福岡)

Sigma-1 受容体賦活化による認知機能障害およびうつ様症状の改善効果

森口茂樹、福永浩司 (第 22 回神経行動薬理若手研究者の集い 3/20/2013 福岡)

T 型カルシウムチャンネル賦活化と認知機能調節

森口茂樹、塩田倫史、田頭秀章、福永浩司 (第 42 回日本神経精神薬理学会年会 10/18-20/2012 宇都宮)

Cognitive deficit via imbalance of CaM kinase II and calcineurin activities in Na⁺/Ca²⁺ exchanger type-2 knockout mice. 森口茂樹、喜多紗斗美、小室一成、岩本隆宏、福永浩司 (第 55 回日本神経化学会大会 9/30-10/2/2012 神戸)

NCX2 欠損マウスにおける認知機能障害と CaM キナーゼ II およびカルシニューリンの活性異常

森口茂樹、喜多紗斗美、岩本隆宏、福永浩司 (第 14 回応用薬理シンポジウム 9/3-4/2012 山梨)

Abnormal fear-related memory via enhancement of CaM kinase II and IV activities in Na⁺/Ca²⁺ exchanger type-1 deficit mice. 森口茂樹、石川隼、喜多紗斗美、小室一成、岩本隆宏、福永浩司 (包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ 7/24-27/2012 仙台)

T-type voltage-gated calcium channel activated by ST101 is a novel molecular target as cognitive enhancer. Shigeki Moriguchi and Kohji Fukunaga (Alzheimer's Association of International Conference (AAIC) 7/14-19/2012 Vancouver Canada)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~yakuri/yakuri_top.html

6. 研究組織
(1)研究代表者
森口茂樹(東北大学大学院薬学研究科・講師)

研究者番号：70374949

(2)研究分担者
福永浩司(東北大学大学院薬学研究科・教授)

研究者番号：90136721

(3)連携研究者
()

研究者番号：