

新規脳機能改善薬 T-588 の カテコラミン放出機構に関する研究

学位論文内容の要旨

高齢化社会の進展に伴い痴呆が深刻な社会問題の一つになっている。近年、アルツハイマー型痴呆はアセチルコリン神経系のみが選択的に障害される疾患ではなく、カテコラミン系をも含む多くの神経伝達に障害があることが明らかになってきている。(R)-(-)-1-(benzo[*b*]thiophen-5-yl)-2-[2-(*N,N*-diethylamino)ethoxy]ethanol hydrochloride (T-588) はアルツハイマー病および脳血管障害に基づく痴呆の治療を目的として開発されてきた化合物であり、種々の動物モデルで学習・記憶障害を改善することが報告されている。

学習・記憶の成立には長期増強の誘導、シナプスの伝達効率の増加、さらに、神経ネットワークの可塑性発現などが関連しており、これらの機序の一つに神経伝達物質放出の増減が挙げられている。In vivo マイクロダイアリシス実験において、ラットに 3 mg/kg あるいは 30 mg/kg T-588 を経口投与すると、大脳皮質および海馬において acetylcholine と noradrenaline (NA) の放出が有意に増加すること、 $[^3\text{H}]$ NA で prelabel されたラット大脳皮質切片からの NA 放出を T-588 が誘起することが報告されている。本研究では、T-588 のシナプス伝達改善作用について NA 放出促進作用を中心に検討した。

1. NA transporter 系に対する T-588 の作用

神経伝達物質の放出は一般的に Ca^{2+} に強く依存した exocytosis によって起こるとされているが、NA のようなカテコラミンでは exocytosis 以外に細胞膜上の transporter を介する放出機構が存在することもよく知られている。近年、NA transporter には Na^+ 依存性以外に Na^+ 非依存性 transporter の存在が報告されている。今回の実験系においても、低 Na^+ buffer 中で、ラット大脳皮質切片への NA 取り込みを認めた。低 Na^+ buffer 中での NA 取り込みは、 Na^+ 依存性 NA 取り込みを阻害する ouabain により抑制されないことを新たに見出した。また、低 Na^+ buffer 中で取り込まれた $[^3\text{H}]$ NA は 20 mM KCl により細胞外 Ca^{2+} に依存して放出された。このことは Na^+ 非依存性 NA 取り込みシステムも機能的な役割を演じていることを示している。

NA transporter 阻害薬 desipramine と T-588 は共に Na^+ 依存性および Na^+ 非依存性 NA 取り込みの両方を抑制し、desipramine が Na^+ 依存性 NA 取り込みに対して感受性が高かったのに対し、T-588 は両取り込みに対し、同等の感受性であった。Desipramine 1 μM (NA 取り込みをほぼ完全に阻害する濃度) は正常あるいは低 Na^+ buffer 中で、NA 放出作用をほとんど示さなかったが、T-588 は desipramine 1 μM を共存させた場合にも NA 放出を促進させた。したがって、T-588 による NA 放出作用は NA の取り込みを抑制したことによる見かけ上の結果ではないと推察された。 Na^+ 含有および低 Na^+ buffer 中での 3 mM T-588 による NA 放出作用は desipramine により抑制されなかったことから、T-588 による NA 放出が NA transporter を介していな

いことが示された。しかし、本研究において見出した Na⁺ 非依存性 transporter 活性に対しても T-588 が阻害活性を有しており T-588 は Na⁺ 非依存性 transporter の機能解析のツールと成り得ると考えられた。

2. NA 放出に対する SH 基修飾試薬と T-588

NA 放出に対する T-588、N-ethylmaleimide (NEM)、S-nitroso-cysteine (SNC) および Hg 含有 SH 基修飾試薬の作用について検討した。NEM、SNC および p-chloromercuri benzoic acid (p-CMBA) のような SH 試薬が誘起する NA 放出は、各々ほぼ完全に dithiothreitol (DTT: SH 基の還元剤) によって阻害された。また、p-CMBA は SNC の作用を減少させたが、NEM の作用には相加的であった。このことから、p-CMBA は NEM ではなく SNC と同一部位に作用すると考えられた。T-588 による NA 放出は DTT 処理や p-CMBA の影響を全く受けなかった。これらの結果から、1) 伝達物質放出に関与する SH 基には p-CMBA や SNC 感受性の SH 基と NEM 感受性 SH 基とが存在すること、2) T-588 の作用は、分泌関連蛋白質の SH 基の修飾ではないことが示された。

3. PC12 細胞における NA 放出および放出関連蛋白質に対する T-588 の作用

神経細胞のモデルとして汎用されている PC12 細胞からの NA 放出に対する T-588 の作用を検討した。T-588 は PC12 細胞において 10 μM の低濃度から [³H]NA 放出を促進し、ionomycin や ATPγS による NA 放出を相加的に増強した。また、ionomycin や ATPγS の作用が外液の Ca²⁺ に依存적であったのに対し、T-588 の NA 放出作用は外液の Ca²⁺ に依存しなかった。これらの結果から、大脳皮質切片と同様 PC12 細胞においても T-588 が Ca²⁺ 依存性 NA 放出とは異なる機序で NA 放出促進作用を有していることが示された。

PC12 細胞に発現しているシナプス小胞蛋白質のうち、シナプス小胞のマーカー蛋白質である synaptophysin および近年シナプス小胞への局在が報告されている SNAP-25 を immunoblotting 法で測定することにより、シナプス小胞の移動に対する T-588 の作用を検討した。T-588 で刺激すると、無刺激時より多くの synaptophysin および SNAP-25 含有シナプス小胞が膜画分から細胞質画分へ、細胞外の Ca²⁺ に依存して、約 4 分の lag time の後に移動してきた。これらの結果は、T-588 が PC12 細胞において Ca²⁺ に依存しない NA 放出を起こす一方で、Ca²⁺ に依存したシナプス小胞の移動をも促進することを示している。

4. GTP 結合蛋白質 (G_s) に対する T-588 の作用

ラット大脳皮質膜標本における cholera toxin (CTX) および pertussis toxin (PTX) による G_s および G_i/G_o 蛋白質の ADP リボシル化に対する T-588 の作用を検討したところ、T-588 はラット大脳皮質膜および膜のコレート抽出物の各標本において CTX の A サブユニットによる G_s の α サブユニットの ADP リボシル化を濃度に依存して抑制した。また CTX による自己 ADP リボシル化が T-588 によって抑制されないこと、さらに PTX による G_i/G_o の α サブユニットの ADP リボシル化に対する T-588 の抑制が G_{sα} に対する抑制に比べ弱かったことから、G 蛋白質に対する T-588 の作用は G_s に特異的であると考えられた。β アドレナリン受容体刺激は G_s と関連して adenylyl cyclase を活性化し cAMP を生成させる。そこで、cAMP 生成反応に対する T-588 の作用を検討したところ、isoproterenol が誘起する cAMP 蓄積を抑制した。これらの結果から、T-588 が G_s と相互作用をしていると考えられた。

T-588 はこれまで報告されている exocytosis とは異なる過程で NA 放出を促進することにより、アルツハイマー型痴呆患者のシナプス伝達を改善し、脳機能改善作用を発揮することが期待される。また、T-588 は神経伝達物質の放出機構を研究する上で、有用なツールと成り得ると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 教 授 五十嵐 靖 之
副 査 助 教 授 井ノ口 仁 一
副 査 助 教 授 村 山 俊 彦

学 位 論 文 題 名

新規脳機能改善薬 T-588 の カテコラミン放出機構に関する研究

申請者は、新規脳機能改善薬 T-588 のシナプス伝達改善作用についてノルアドレナリン (NA) 放出促進作用を中心に検討してきたが、今回、T-588 による NA 放出機構にシナプス小胞移動や GTP 結合蛋白質が関与することを明らかにするとともに、NA 放出機構には Na^+ 非依存性 NA 取り込みシステムの関与や、複数の SH 基による調節が存在するという新知見を得、本学位論文として申請した。

近年、NA transporter には Na^+ 依存性以外に Na^+ 非依存性 transporter の存在が報告されている。低 Na^+ buffer 中で取り込まれた [^3H]NA は 20 mM KCl により細胞外 Ca^{2+} に依存して放出されることを新たに見いだし、 Na^+ 非依存性 NA 取り込みシステムも機能的な役割を演じていることを示唆した。

T-588 は Na^+ 依存性および Na^+ 非依存性 NA 取り込みの両方を同等の感受性で抑制した。NA transporter 阻害薬 desipramine は 1 μM (NA 取り込みをほぼ完全に阻害する濃度) で正常あるいは低 Na^+ buffer 中で、NA 放出作用をほとんど示さなかったが、T-588 は 1 μM desipramine を共存させた場合にも NA 放出を促進させた。したがって、T-588 による NA 放出作用は NA の取り込みを抑制したことによる見かけ上の結果ではないと推察した。さらに、正常および低 Na^+ buffer 中での 3 mM T-588 による NA 放出作用がともに desipramine により抑制されなかったことから、T-588 による NA 放出が NA transporter を介していないと示唆した。

N-ethylmaleimide (NEM)、S-nitroso-cysteine (SNC) および p-chloromercuribenzoic acid (p-CMBA) のような SH 試薬が誘起する NA 放出は、各々ほぼ完全に dithiothreitol (DTT) によって阻害された。また、p-CMBA は SNC の作用を減少させたが、NEM の作用には相加的であった。一方、T-588 による NA 放

出は DTT 処理や p-CMBA の影響を全く受けなかった。これらの結果から、1) 伝達物質放出に関与する SH 基には p-CMBA や SNC 感受性の SH 基と NEM 感受性 SH 基とが存在すること、2) T-588 の作用は、分泌関連蛋白質の SH 基の修飾ではないことを示唆した。

つぎに、申請者は神経細胞のモデルとして繁用されている PC12 細胞からの NA 放出に対する T-588 の作用を検討した。そして T-588 が PC12 細胞において $10\ \mu\text{M}$ の低濃度から外液の Ca^{2+} に非依存的に [^3H]NA 放出を促進し、ionomycin や ATP γ S による外液の Ca^{2+} に依存した NA 放出を相加的に増強することを示した。これらの結果から、大脳皮質切片と同様 PC12 細胞においても T-588 が Ca^{2+} 依存性 NA 放出とは異なる機序で NA 放出促進作用を有していることを示唆した。

また、PC12 細胞に発現しているシナプス小胞蛋白質のうち、シナプス小胞のマーカー蛋白質である synaptophysin や近年シナプス小胞への局在が報告されている SNAP-25 を immunoblotting 法で測定することにより、シナプス小胞の移動に対する T-588 の作用を検討した。T-588 で刺激すると、synaptophysin および SNAP-25 含有シナプス小胞が膜画分から細胞質画分へ、細胞外の Ca^{2+} に依存して移動してくることを明らかにした。これらの結果から、T-588 が PC12 細胞において Ca^{2+} に依存しない NA 放出を起こす一方で、 Ca^{2+} に依存したシナプス小胞の移動をも促進することを示唆した。

さらに、ラット大脳皮質膜標本における cholera toxin (CTX) および pertussis toxin (PTX) による G_s および G_i/G_o 蛋白質の ADP リボシル化に対する T-588 の作用を検討し、T-588 がラット大脳皮質膜および膜のコレート抽出物の各標本において CTX による G_s の ADP リボシル化を濃度に依存して抑制することを明らかにした。また CTX の自己 ADP リボシル化が T-588 によって抑制されないこと、さらに PTX による G_i/G_o の ADP リボシル化に対する T-588 の抑制が G_s に対する抑制に比べ弱かったことから、G 蛋白質に対する T-588 の作用は G_s に特異的であると推定した。 β アドレナリン受容体刺激は G_s と関連して adenylylase を活性化し cAMP を生成させるが、T-588 は isoproterenol が誘起する cAMP 蓄積を抑制した。これらの結果から、T-588 が G_s と抑制的に相互作用をしていることを示唆した。

したがって、申請者は、T-588 がこれまで報告されている exocytosis とは異なる過程で NA 放出を促進することにより、アルツハイマー型痴呆患者のシナプス伝達を改善し、脳機能改善作用を発揮することが期待されること、また、T-588 が神経伝達物質の放出機構を研究する上で、有用なツールと成り得ると結論した。

以上、本審査委員会は本論文を新規脳機能改善薬 T-588 のカテコラミン放出機構に関し新知見を得るとともに、NA 放出機構への Na^+ 非依存性 NA 取り込みシステムの関与や、複数の SH 基による調節の関与を示唆した内容であると判定し、博士(薬学)の学位を受けるに十分値すると認めた。