

令和 1 年 5 月 17 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860259

氏 名 矢人 遼
(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： カルガリー大学 （国名： カナダ ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

T 型カルシウムチャネルの賦活化機構と脳機能に関する神経薬理学的研究3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 24 日 ～ 平成 31 年 4 月 23 日

4. 受入機関名及び部局名

カルガリー大学 医学部 生理・薬理学分野5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

T 型カルシウムチャネルは低閾値で一過性に開口する電位依存性カルシウムチャネルである。他の電位依存性カルシウムチャネルは $\alpha 1$ サブユニットに加え、 β 、 γ および $\alpha 2\delta$ サブユニットが必要であるが、T 型カルシウムチャネルは $\alpha 1$ サブユニットのみで機能する (図 1)。脳には Cav3.1、Cav3.2 および Cav3.3 全てのサブタイプが発現しており、痛み、睡眠およびてんかんの神経伝達を調節している (François A et al., 2014. Pflugers Arch. 466:707-717.; Zamponi GW et al., 2010. Pflugers Arch. 460(2):395-403.; Pellegrini C et al., 2016. Sleep. 39:875-885.)。視床において、Cav3.1 T 型カルシウムチャネルはグルタミン酸作動性の視床-皮質神経細胞に局在し、Cav3.2 および Cav3.3 T 型カルシウムチャネルは GABA 作動性の抑制性神経細胞に局在し、疼痛反応に関与している。一方、海馬や前頭前皮質といった脳高次機能を司る脳領域における T 型カルシウムチャネル機能および局在については未だ良くわかっていない。最近、T 型カルシウムチャネルが神経可塑性および認知機能に関与することがわかってきた (Lee S et al., 2011. Nat Neurosci. 15:308-314.)。特別研究員の研究グループでは、**新規アルツハイマー病治療候補薬 ST101 が Cav3.1 T 型カルシウムチャネル**

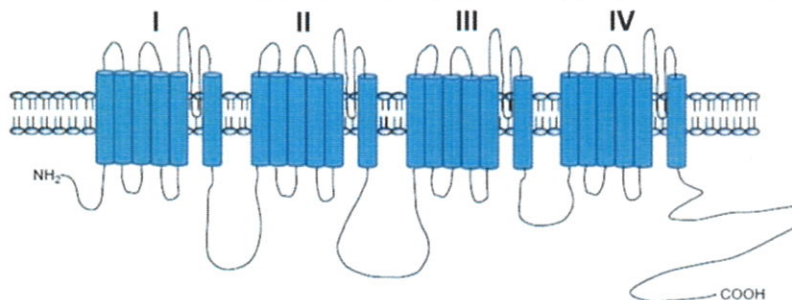
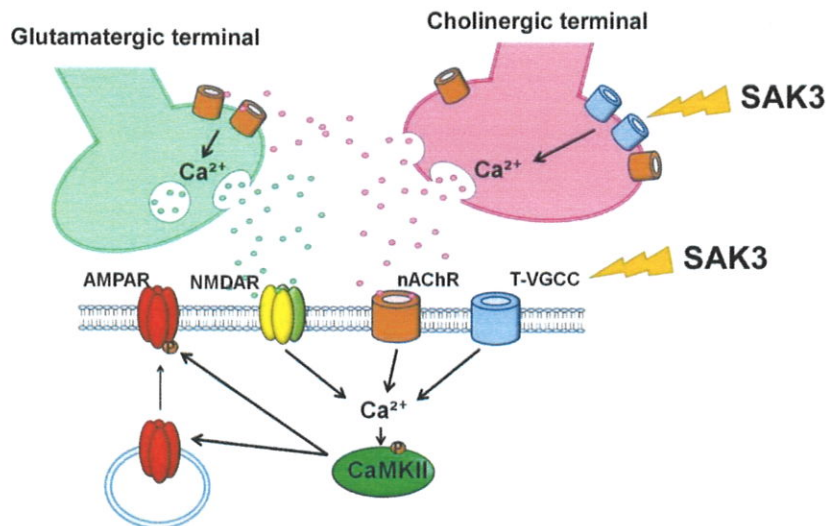


図 1 T 型カルシウムチャネルの構造

T 型カルシウムチャネルの $\alpha 1$ サブユニットは、相同性のある 4 つのドメインより構成される。低閾値 (-60 mV) で活性化され、一過性 (Transient) にチャネルを開口し、細胞内にカルシウムを流入させる。

を賦活化し、ラット皮質において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) 自己リン酸化反応を亢進し、長期増強 (LTP) を促進することを見出した (Moriguchi S et al., 2012. J Neurochem. 121:44-53.)。また、ST101 は T 型カルシウムチャネル賦活化を介し、マウス海馬におけるアセチルコリン (ACh) 遊離を促



Induction of LTP and Memory formation

図2 SAK3 による認知機能障害改善作用機序

SAK3 は海馬コリン神経終末に発現している T 型カルシウムチャネルを賦活化し、ACh 遊離を促進する。結果、グルタミン酸遊離も促進され、後シナプスの NMDA 受容体やニコチン性 ACh 受容体を活性化し、CaMKII 活性を亢進することで認知機能を改善すると考えられる。

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

AMPA, AMPA 受容体; NMDAR, NMDA 受容体; nAChR, ニコチン性 ACh 受容体; LTP, 長期増強; T-VGCC, T 型カルシウムチャネル

アルツハイマー病治療薬として知られているコリンエステラーゼ阻害薬であるドネペジルとの併用投与により相乗効果がみられた (Gauthier S et al., 2015. J Alzheimers Dis. 48:473-481.)。そこで、特別研究員の研究グループは、ST101 の誘導体を作製し、新たな spiroimidazopyridine 化合物 SAK を創製した。認知機能障害改善を目指す上で、SAK 中から活性が強力なものを探索する必要がある。また、脳における T 型カルシウムチャネルの局在を明らかにし、ACh 遊離促進機構を解明する必要がある。

そこで、ST101 (0.1 nM) および SAK 化合物 (1-5: 0.1 nM) をマウス急性海馬スライスに処置し、40 分間作用させ、免疫ブロット法を用い、記憶学習獲得に必須のプロテインキナーゼである calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) 活性を検討した。検討化合物の中で、**SAK3 (0.1 nM) のみが CaMKII 自己リン酸化反応を有意に亢進した**。また、SAK3 による CaMKII 自己リン酸化反応亢進作用は、T 型カルシウムチャネル阻害薬では拮抗されたが、他の電位依存性カルシウムチャネル阻害薬では抑制されなかった。SAK3 による T 型カルシウムチャネル賦活化作用をホールセルパッチクランプ法により解析したところ、Cav3.1 および Cav3.3 チャネル電流を亢進することがわかった。この電流亢進作用は ST101 よりも強力であった。Cav3.1 および Cav3.3 チャネルは中隔野のコリン神経細胞と、その投射先の海馬におけるコリン神経終末に局在していた。そこで、ST101 (0.5 mg/kg, p.o.) または SAK3 (0.5 mg/kg, p.o.) を野生型マウスに投与し、ACh 遊離量について in vivo マイクロダイアリシス法を用い検討した。記憶を司る海馬において、SAK3 (0.5 mg/kg, p.o.) 投与群のみ ACh 遊離が亢進した。SAK3 による ACh 遊離促進作用は T 型カルシウムチャネル阻害薬処置または Cav3.1 欠損マウスで有意に抑制された。同様に、SAK3 は嗅球摘出マウスにみられる認知機能障害を T 型カルシウムチャネル賦活化し改善した。故に、**SAK3 は T 型カルシウムチャネルを介し、直接 ACh 遊離を促進することで認知機能を亢進すると考えられる (図 2: Yabuki Y et al., 2017. Neuropharmacology. 117:1-13.; Fukunaga K et al., 2019. J Pharmacol Sci. 139:51-58.)**。一方、SAK3 の Cav3.1 および Cav3.3 チャネル電流を亢進作用のメカニズムは不明である。海馬では Cav3.1 T 型カルシウムチャネルは抑制性の GABA 神経系に発現しているが (Tang AH et al., 2011. J Neurosci. 31:13546-13561.)、興奮性および抑制性神経伝達における T 型カルシウムチャネルの機能については良くわかっていない。痛覚を調節する視床においては Cav3.1 は視床皮質系グルタミン酸作動性神経に局在し、Cav3.2 および Cav3.3 は視床網様核の GABA 作動性神経細胞に発現している (Broicher T et al., 2008. Mol Cell Neurosci. 39:384-399.)。本研究では、T 型カルシウムチャネルの世界的権威であるカルガリー大学教授 Gerald W. Zamponi 博士の下で、SAK3 の T 型カルシウムチャネル活性化機構の解明と興奮性および抑制

進する (Yamamoto Y et al., 2013. J Pharmacol Sci. 121:212-226.)。さらに、ST101 の慢性投与は嗅球摘出 (OBX) マウスおよびアミロイド β (A β) 注入ラットにおける記憶障害を改善する (Han F et al., 2008. J Pharmacol Exp Ther. 326:127-134.; Yamaguchi Y et al., 2006. J Pharmacol Exp Ther. 317:1079-1087.)。これらの結果は、T 型カルシウムチャネルが神経可塑性および認知機能に重要な役割を担っており、認知機能障害改善薬の新しい標的分子になり得ることを示唆している。

一方、T 型カルシウムチャネル賦活化による ACh 遊離促進機構のメカニズムは不明であった。また、ST101 はアメリカにおいてアルツハイマー病を対象に臨床第 II 相試験が実施され、世界的な

性神経伝達における T 型カルシウムチャネル機能の解明を目指した。これまでの T 型カルシウムチャネル機能解析の研究は、阻害薬または遺伝子欠損マウスを用いた実験のみである。また、中枢神経系において、Cav3.2 T 型カルシウムチャネルの解析はされているが、Cav3.1 および Cav3.3 T 型カルシウムチャネルの機能解析は進んでいない。T 型カルシウムチャネルを賦活化する化合物の発見は世界初であり、独創性は極めて高い。T 型カルシウムチャネルの生理機能を解明する上で、活性化による機能解析は必須である。本研究は、T 型カルシウムチャネルを賦活化する機序を解明すると共に、中枢神経系における T 型カルシウムチャネル機能の解明を目指す世界に先駆けた研究である。また、SAK3 は国立研究開発法人日本医療研究開発機構の支援を受け、ラットおよびマウスを用いた毒性試験を終了し、高い安全性を確認している。今後、アルツハイマー病を対象に臨床試験に進む予定であり、SAK3 を用いた T 型カルシウムチャネル機能の解析は臨床開発を進める上で重要である。

SAK3 は Cav3.1 および Cav3.3 T 型カルシウムチャネルの活性化・不活性化機構には影響を与えない (Yabuki et al., 2017. *Neuropharmacology*. 117:1-13.)。チャネル電流値はチャネル開口時間および開口頻度により決定されるため (Tsien RW et al., 1986. *J Mol Cell Cardiol*. 18:691-710.)、SAK3 は T 型カルシウムチャネルのシングルチャネルコンダクタンスに影響を与えられと考えられる。T 型カルシウムチャネルのシングルチャネルコンダクタンスは 7.5–11 pS と非常に微小であり (Perez-Reyes E et al., 2003. *Physiol Rev*. 83:117-161.)、測定および解析は困難である。カルガリー大学において、T 型カルシウムチャネルのシングルチャネル記録の手法を学習・習得することが出来た。現在、データの解析を進めると共に、現所属先で実験系の立ち上げと追加解析を行っている。さらに、SAK3 の構造を展開し、T 型カルシウムチャネルに作用する化合物をいくつか同定することが出来た。これら化合物の生理活性、薬理作用についても今後検討する予定である。また、SAK3 の誘導体をプローブ化し、光親和性標識法をもちい、T 型カルシウムチャネルとの結合を検討した。脳組織を用いた実験では、Cav3.1 T 型カルシウムチャネルと同分子量の蛋白質との結合を検出した。現在、Cav3.1 および Cav3.3 過剰発現細胞および Cav3.1 欠損マウスの脳組織を用い、T 型カルシウムチャネルとの結合を検討している。

脳スライスを用いた興奮性シナプス後電流 (EPSC) および抑制性シナプス後電流 (IPSC) を測定する実験系を確立し、現在、遺伝子欠損マウスと SAK3 を使用し、興奮性神経伝達 (EPSC) および抑制性神経伝達 (IPSC) における T 型カルシウムチャネル機能について解析を進めている。また、in vivo マイクロダイアリシス法を用いた検討では、SAK3 が興奮性神経伝達を調節しているグルタミン酸、抑制性神経伝達を調節している GABA 遊離にも影響を与えることがわかった。加えて、光遺伝学 (オプトジェネティクス) を用い、光依存的に抑制性神経活性を調節する手法を習得した。チャネルロドプシン 2 は 473 nm の波長光 (ブルーライト) により活性化され、ナトリウムやカルシウムを細胞内に透過し、細胞を脱分極・活性化させることが出来る。一方、アーチロドプシン T は 589 nm 波長光 (イエローライト) により活性化され、プロトン細胞外に排出することによ

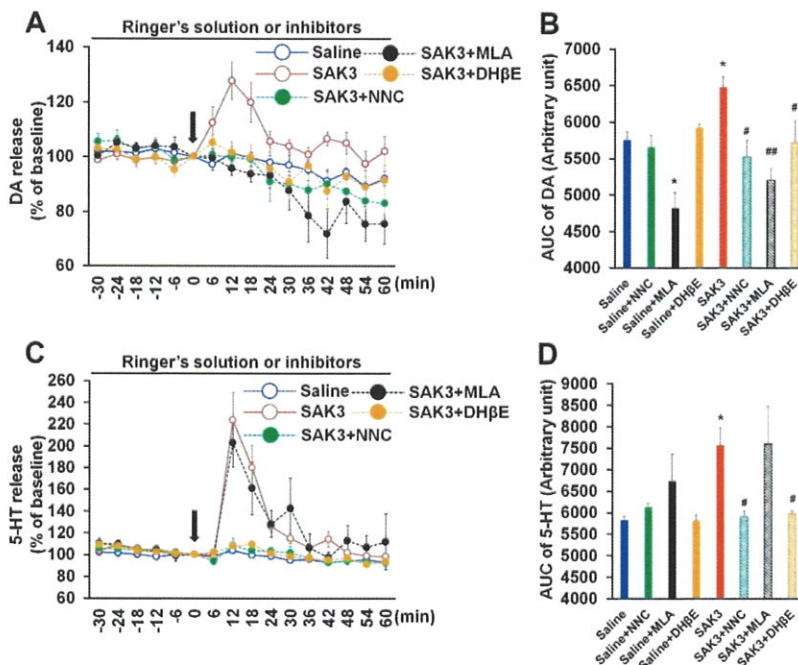


図3 SAK3 によるモノアミン遊離促進作用

SAK3 は海馬においてドパミン・セロトニン遊離を促進する。この促進作用は T 型カルシウムチャネル阻害薬 NNC 55-0396 の処置により拮抗される。また、SAK3 のモノアミン遊離促進作用は nAChR 阻害薬である MLA および DhβE 処置によっても抑制されることから、ACh 遊離促進作用 (図 2) を介してモノアミン遊離を促進していると考えられる。

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

DHβE, dihydro-β-erythroidine (α4 受容体拮抗薬); MLA, methyllycaconitine (α7 受容体拮抗薬); NNC, NNC 55-0396 (T 型カルシウムチャネル阻害薬)

り細胞を過分極させる。Ai32 および Ai40D マウスはそれぞれチャンネルロドプシン 2、アーチロドプシン T の flox マウスであり、パルブアルブミン (PV)-Cre マウスと交配させることで GABA 神経細胞特異的にチャンネルロドプシン 2、またはアーチロドプシン T チャンネルを発現させた (Zhang Z et al., 2015. Cell Rep. 12(5):752-759.)。実際に、レーザーを当て、GABA 抑制性神経活動のある脳部位で活性化・不活性化すると面白いフェノタイプを示す。現在、T 型カルシウムチャンネル機能との関係について検討しており、将来的には光遺伝学を利用し、Cav3.1 欠損マウスにおける神経活動を in vivo で操作し行動評価を行う予定である。

カルガリー大学の Zamponi 研究室において、これまでの研究背景と今後の展望について英語で発表し、ディスカッションを行ってきた。その結果、日本に帰国後も共同研究を進めると共に、今後の研究方針について固めることが出来た。また、2018 年 4 月から 2019 年 4 月にかけて、英科学雑誌に研究成果を 2 報報告した。SAK3 (0.5 mg/kg, p.o.) 投与により、嗅球摘出マウスにみられるうつ様行動が改善した。この改善作用は、海馬歯状回で低下した神経新生の改善作用と良く関連した。細胞内情報伝達を検討すると、嗅球摘出マウス海馬歯状回では CaMKII を含むカルシウムシグナルの低下がみられ、うつ病に重要な分子である脳由来栄養因子の低下が顕著であったが、SAK3 はこれを改善した。これら、SAK3 の改善作用は T 型カルシウムチャンネル阻害薬により拮抗された (Xu J and Yabuki Y et al., 2018. J Pharmacol Sci. 137:333-341.)。以上の結果は、T 型カルシウムチャンネルが海馬神経新生に重要であることを示唆している。一方、SAK3 はうつ病にも関連するモノアミン (ドパミン・セロトニン) 遊離を海馬において促進した。この促進作用は T 型カルシウムチャンネル阻害薬 (NNC 55-0396) およびニコチン性 ACh 受容体阻害薬 ($\alpha 4$ 受容体拮抗薬: dihydro- β -erythroidine (DH β E); $\alpha 7$ 受容体拮抗薬: methyllycaconitine (MLA)) により拮抗されることから、SAK3 は T 型カルシウムチャンネルを介し直接的に、ACh シグナル活性化を介して間接的にモノアミン遊離を促進すると考えられる (図 3)。さらに、SAK3 はアルツハイマー病モデルマウスの海馬においてもモノアミン遊離促進した (Wang S and Yabuki Y et al., 2018. PLoS One. 13:e0206986.)。また、SAK3 はアルツハイマー病モデルマウスにみられる記憶障害を改善した。興味深いことに、SAK3 を投与するとアミロイド β 蛋白質の沈着が抑制された。これら結果をまとめ、総説として研究成果を報告した (Fukunaga K et al., 2019. J Pharmacol Sci. 139(2):51-58.)。また、これら研究成果は 2019 年に 2 学会にて発表を予定している。

本研究により、SAK3 の T 型カルシウムチャンネル賦活化機構の一端と、T 型カルシウムチャンネルによる興奮性神経伝達および抑制性神経伝達における機能を解明する地盤を築き上げることができた。今後、さらに研究を発展させ脳における T 型カルシウムチャンネル機能の解明を目指したい。最後に、本研究をご支援くださった日本学術振興会海外特別研究員制度に心より厚く御礼申しあげ、結びの言葉とさせて頂きたい。

原著論文

- [1] Wang S., **Yabuki Y. (equal contribution)**, Matsuo K., Xu J., Izumi H., Sakimura K., Saito T., Saido T.C., 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. (2018)
- [2] Xu J., **Yabuki Y. (equal contribution)**, Yu M., Fukunaga K. 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. (2018)

総説

- [1] Fukunaga K., Izumi H., **Yabuki Y.**, Shinoda Y., Shioda N., Han F. Alzheimer's disease therapeutic candidate SAK3 is an enhancer of T-type calcium channels. *J Pharmacol Sci*. 139(2):51-58. (2019)

学会発表 (予定)

- [1] **Yasushi Yabuki**, Xu Jing and Kohji Fukunaga. 「T-type calcium channels are involved in adult mouse hippocampal neurogenesis.」 Neuro2019. 2019 年 7 月 25-28 日 新潟
- [2] **Yasushi Yabuki** and Kohji Fukunaga. 「T-type calcium channels are critical for adult mouse hippocampal neurogenesis.」 6th Congress of AsCNP. 2019 年 10 月 11-13 日 博多