

日本神経化学会奨励賞受賞者研究紹介

脳における T 型カルシウムチャネル機能解析に関する研究 Research of T-type calcium channel function in the brain

矢吹 悌

(東北大学大学院薬学研究科薬理学分野)

はじめに

T 型カルシウムチャネルは早い不活性化と遅い脱活性化を特徴とし、低閾値(約 -60mV)で開口するカルシウムチャネルである¹⁾。T 型カルシウムチャネルには Cav3.1 ($\alpha 1\text{G}$)、Cav3.2 ($\alpha 1\text{H}$) および Cav3.3 ($\alpha 1\text{I}$) の 3 種類が存在し、主に脳と心臓のペースメーカー細胞に発現がみられる。他の電位依存性カルシウムチャネルとは違い、 $\alpha 2\delta$ 、 β および γ サブユニットを必要とせず、 $\alpha 1$ サブユニットのみで機能する。遺伝子欠損マウスと阻害薬を用いた検討から、T 型カルシウムチャネルはてんかん発作や痛み、睡眠に関与することが知られている¹⁾²⁾。しかしながら、記憶学習機能および神経可塑性に対する役割については不明である。

本稿では T 型カルシウムチャネルの脳高次機能における役割について過去の報告と筆者たちの研究成果を紹介する。

1. T 型カルシウムチャネルによるシナプス可塑性と記憶学習機能調節

齧歯類の脳において、T 型カルシウムチャネルは脳全体に広く発現がみられる³⁾。記憶学習獲得に重要な脳領域である海馬において、in situ ハイブリダイゼーション法の結果から Cav3.1、Cav3.2 および Cav3.3 mRNA 発現が海馬の錐体細胞層にみられた³⁾。それぞれのチャネルがグルタミン酸作動性興奮性神経細胞の細胞体および GABA 作動性抑制性神経細胞の細胞体・神経終末に局在して

おり^{4)~6)}、神経細胞のシナプス可塑性を直接的に調節していることが考えられる。実際に、ニッケル ($50\mu\text{M}$) で T 型カルシウムチャネルを阻害すると、ラット体性感覚皮質における長期抑制(LTD)が消失する⁷⁾。また、ラット海馬歯状回の新生細胞におけるカルシウムスパイクは T 型カルシウムチャネル依存的である⁸⁾。さらに、脊髄神経細胞では、低濃度のニッケルおよび T 型カルシウムチャネル阻害薬ミベフラジル処置により、自発性興奮性シナプス後電流が抑制されることから⁹⁾¹⁰⁾、T 型カルシウムチャネルは低閾値のエキソサイトーシスで構成される自発的な神経伝達において重要な役割を担っていると考えられる。

Cav3.2 欠損マウスにおいて、文脈的恐怖記憶想起障害と新規物体認識試験における認知機能障害が報告されているが¹¹⁾¹²⁾、Cav3.1 および Cav3.3 欠損マウスに関する報告はない。ホスホリパーゼ C $\beta 4$ 欠損マウスでは、視床背内側核における T 型カルシウムチャネル機能が亢進しており、恐怖記憶消去が障害される¹³⁾。この恐怖記憶消去障害はミベフラジルの視床背内側核局所投与により拮抗される¹³⁾。以上のことから、T 型カルシウムチャネルが正常な記憶形成・維持および認知機能に関与することが示唆される。

2. T 型カルシウムチャネル賦活薬 ST101 の発見

筆者たちの研究グループでは新規アルツハイマー病治療候補薬である spiro [imidazo [1,2-a]

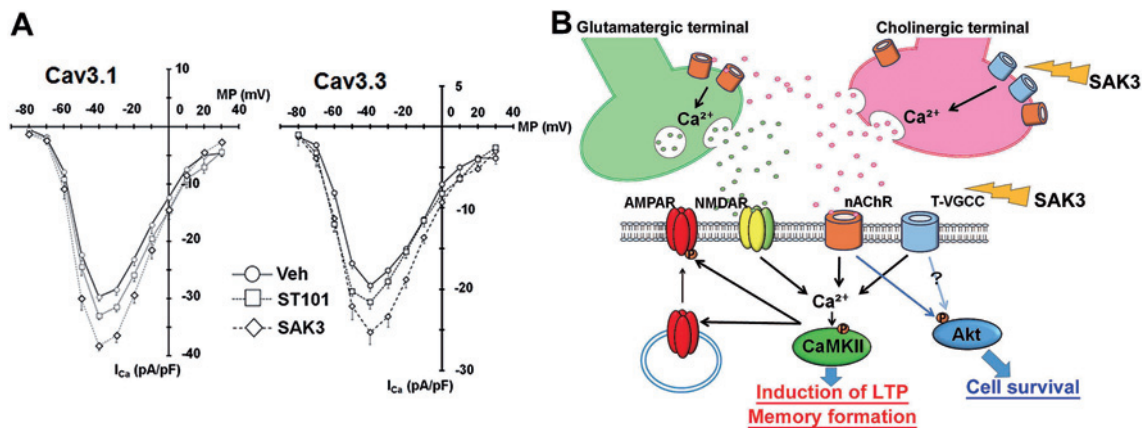


図1 ST101/SAK3によるCav3電流促進作用とT型カルシウムチャネル賦活化による脳機能改善作用のメカニズム (A) ST101 (0.1 nM) またはSAK3 (0.1 nM) を処置した際のCav3.1 (左) およびCav3.3チャネルの電流-電圧曲線。SAK3の方がST101よりも賦活化作用が強力である。(B) T型カルシウムチャネルが活性化することで海馬ACh遊離が促進する。結果、グルタミン酸も遊離され、後シナプスのNMDA受容体やnAChRを活性化し、CaMKII活性を亢進することで認知機能を改善すると考えられる。一方、nAChRの活性化はAkt活性を促進し、神経保護作用を示す。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 (参考文献¹⁷⁾より改変)

pyridine-3,2-indan]-2 (3H)-one (ST101) (全薬工業株式会社) の記憶学習障害改善効果のメカニズムを解明した。ST101はアミロイドβ注入ラットの海馬においてニコチン誘発性アセチルコリン(ACh)遊離を促進し、記憶学習障害を改善する化合物である¹⁴⁾。ST101慢性経口投与により、嗅球摘出(OBX)マウスにみられる記憶学習障害が改善する¹⁵⁾。記憶学習障害改善効果と良く相関し、OBXマウス海馬CA1領域で低下した記憶学習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)自己リン酸化反応はST101慢性投与により改善した¹⁵⁾。その結果、OBXマウス海馬における長期増強(LTP)障害が改善した¹⁴⁾。よって、ST101はCaMKII活性を亢進し、神経可塑性の低下を改善することで記憶学習障害を改善すると考えられる。そこで、CaMKII自己リン酸化反応亢進作用の機序を解明する目的で、ラット体性感覚皮質スライスにST101(0.1nM)を処置し、阻害薬を用いST101の標的を探索した。その結果、ST101処置により亢進したCaMKII自己リン酸化反応は、ミベフラジルの前処置により拮抗されたが、他の電

位依存性カルシウムチャネル拮抗薬では抑制されなかった¹⁶⁾。また、ミベフラジルはST101(0.1nM)処置によるラット体性感覚皮質スライスLTP誘導・維持亢進作用も拮抗した¹⁶⁾。Cav3.1を過剰発現させたneuro2A細胞を用い、ホールセルパッチクランプ法により、Cav3.1電流を測定したところ、ST101(0.1nM)処置により、Cav3.1電流が有意に亢進した¹⁶⁾。このことは、ST101の標的分子の一つがT型カルシウムチャネルであることを示唆している。

3. T型カルシウムチャネル賦活薬SAK3の神経薬理作用

次に、筆者たちはST101よりも活性の強い化合物を得るために、構造最適化を行いSAK3を創製した¹⁷⁾。SAK3は記憶回路である海馬のCaMKII活性とLTPを著しく上昇させた。ST101にはこの効果は見られなかった。SAK3によるCaMKII活性化反応はT型カルシウムチャネル特異的阻害薬NNC 55-0396処置により完全に阻害された。Cav3.1過剰発現neuro2A細胞においてホールセ

ルパッチクランプ法により電流を測定したところ、ST101 よりも SAK3 の方がより強力に Cav3.1 電流を促進した (図 1A)。Cav3.3 電流に対しても同様に、SAK3 は ST101 よりも強力に電流を亢進した (図 1A)。一方、Cav3.2 電流に対してはどちらの化合物も促進効果を示さなかった。Cav3.1 および Cav3.3 の海馬における局在を検討したところ、どちらも海馬錐体細胞の細胞体に局在がみられ、コリン作動性神経のマーカーである ChAT 陽性の神経終末との共局在も確認できた¹⁷⁾。また、海馬にコリン神経を投射している内側中隔野 ACh 神経細胞においても Cav3.1 および Cav3.3 が発現していた。そこで、海馬における ACh 遊離について検討したところ、ST101 の経口投与では ACh 遊離は促進されなかった。一方、SAK3 の経口投与は海馬 ACh 遊離を有意に促進した。SAK3 による ACh 遊離促進作用は NNC 55-0396 処置または Cav3.1 欠損マウス海馬において有意に抑制された¹⁷⁾。さらに、OBX マウスの記憶学習障害に対し、SAK3 急性投与は T 型カルシウムチャネル賦活化を介し改善効果を示した。以上の結果から、T 型カルシウムチャネル賦活化は ACh 遊離を促進し、プレシナプスおよびポストシナプスに局在する ACh 受容体を活性化し、細胞内カルシウム濃度が高まることで CaMKII が活性化され、記憶学習障害を改善すると考えられる (図 1B)。

おわりに

本稿では、T 型カルシウムチャネルの神経可塑性と記憶学習機能における役割について過去の報告と筆者たちの神経薬理学的研究成果から紹介した。ST101 は安全性が非常に高く、アルツハイマー病を対象にアメリカにおいて臨床試験第 II 層を終えた段階である。SAK3 も同様に安全性が高く、非臨床安全性試験では目立った毒性はみられなかった。また、SAK3 は脳虚血に対する神経保護作用¹⁸⁾ (図 1B) や甲状腺機能低下による認知機能障害に対する改善効果¹⁹⁾があり、アルツハイマー病だけでなく、様々な認知障害に応用できる可能性がある。

一方、T 型カルシウムチャネルの脳高次機能における役割については未だ不明な点が多い。今後は遺伝子欠損マウスを用い、より詳細に脳における T 型カルシウムチャネルの生理機能を明らかにしたい。

謝 辞

本稿で紹介した研究を遂行するにあたり、御指導を賜りました東北大学大学院薬学研究科薬理学分野 福永浩司教授にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。また、Cav3.1 欠損マウスを提供くださいました新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野 崎村建司教授に心より御礼申し上げます。最後に、本稿執筆の機会を与えてくださいました神経化学会奨励賞選考委員の先生方、関係者の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev*, 83, 117-161 (2003).
- 2) Zamponi GW, Lory P, Perez-Reyes E. Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Pflugers Arch*, 460, 395-403 (2010).
- 3) Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, Bayliss DA. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci*, 19, 1895-1911 (1999).
- 4) Broicher T, Kanyshkova T, Meuth P, Pape HC, Budde T. Correlation of T-channel coding gene expression, IT, and the low threshold Ca²⁺ spike in the thalamus of a rat model of absence epilepsy. *Mol Cell Neurosci*, 39, 384-399 (2008).
- 5) Liu XB, Murray KD, Jones EG. Low-threshold calcium channel subunit Ca(v) 3.3 is specifically localized in GABAergic neurons of rodent thalamus and cerebral cortex. *J Comp Neurol*, 519, 1181-1195 (2011).

- 6) Tang AH, Karson MA, Nagode DA, McIntosh JM, Uebele VN, Renger JJ, Klugmann M, Milner TA, Alger BE. Nerve terminal nicotinic acetylcholine receptors initiate quantal GABA release from perisomatic interneurons by activating axonal T-type (Cav3) Ca²⁺ channels and Ca²⁺ release from stores. *J Neurosci*, 31, 13546-13561 (2011).
- 7) Nevian T, Sakmann B. Spine Ca²⁺ signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J Neurosci*, 26, 11001-11013 (2006).
- 8) Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429, 184-187 (2004).
- 9) Carbone E, Giaccipoli A, Marcantoni A, Guido D, Carabelli V. A new role for T-type channels in fast "low-threshold" exocytosis. *Cell Calcium*, 40, 147-154 (2006).
- 10) Cueni L, Canepari M, Adelman JP, Lüthi A. Ca²⁺ signaling by T-type Ca²⁺ channels in neurons. *Pflugers Arch*, 457, 1161-1172 (2009).
- 11) Chen CC, Shen JW, Chung NC, Min MY, Cheng SJ, Liu IY. Retrieval of context-associated memory is dependent on the Ca(v)3.2 T-type calcium channel. *PLoS One*, 7, e29384 (2012).
- 12) Gangarossa G, Laffray S, Bourinet E, Valjent E. T-type calcium channel Cav3.2 deficient mice show elevated anxiety, impaired memory and reduced sensitivity to psychostimulants. *Front Behav Neurosci*, 18, 8: 92 (2014).
- 13) Lee S, Ahmed T, Lee S, Kim H, Choi S, Kim DS, Kim SJ, Cho J, Shin HS. Bidirectional modulation of fear extinction by mediodorsal thalamic firing in mice. *Nat Neurosci*, 15, 308-314 (2011).
- 14) Yamaguchi Y, Miyashita H, Tsunekawa H, Mouri A, Kim HC, Saito K, Matsuno T, Kawashima S, Nabeshima T. Effects of a novel cognitive enhancer, spiro[imidazo-[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one (ZSET 1446), on learning impairments induced by amyloid-beta1-40 in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 317, 1079-1087 (2006).
- 15) Han F, Shioda N, Moriguchi S, Yamamoto Y, Raie AY, Yamaguchi Y, Hino M, Fukunaga K. Spiro[imidazo[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one (ZSET 1446/ST101) treatment rescues olfactory bulbectomy-induced memory impairment by activating Ca²⁺/calmodulin kinase II and protein kinase C in mouse hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther*, 326, 127-134 (2008).
- 16) Moriguchi S, Shioda N, Yamamoto Y, Tagashira H, Fukunaga K. 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).
- 17) Yabuki Y, Matsuo K, Izumi H, Haga H, Yoshida T, Wakamori M, Kakei A, Sakimura K, Fukuda T, Fukunaga K. Pharmacological properties of SAK3, a novel T-type voltage-gated Ca²⁺ channel enhancer. *Neuropharmacology*, 117, 1-13 (2017).
- 18) Yabuki Y, Jing X, Fukunaga K. The T-type calcium channel enhancer SAK3 inhibits neuronal death following transient brain ischemia via nicotinic acetylcholine receptor stimulation. *Neurochem Int*, 108, 272-281 (2017).
- 19) Noreen H, Yabuki Y, Fukunaga K. Novel spiroimidazopyridine derivative SAK3 improves methimazole-induced cognitive deficits in mice. *Neurochem Int*, 108, 91-99 (2017).