



# Nefiracetam facilitates hippocampal neurotransmission by a mechanism independent of the piracetam and aniracetam action

野村, 保

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-08-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2430

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002430>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【139】

氏 名・(本 籍) 野村 保 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博ろ第1746号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成12年8月9日

【学位論文題目】

Nefiracetam facilitates hippocampal neurotransmission by a mechanism independent of the piracetam and aniracetam action

(ネフィラセタムはピラセタム及びアニラセタムとは異なる作用機序によって海馬神経伝達を増強する)

審 査 委 員

主査 教授 伊東 宏

教授 住野 公昭 教授 前田 盛

## [緒言]

中枢神経系におけるニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体は、記憶や学習機能に大きな役割を果たし、加えて痴呆患者の脳内では、その数が著明に減少していることが報告されている。ピロリドン誘導体の一つであるネフィラセタムは向知性薬として開発されてきた薬剤であるが、その作用機序として、このnACh受容体を標的にしていることが示唆されている。先に我々は、海馬CA1シナプス伝達において、ネフィラセタムがnACh受容体を介して、学習・記憶と関連する長期増強現象 (LTP) 様効果を引き起こすことを報告している (参考論文)。今回の研究で我々は、ネフィラセタムが海馬神経伝達をCA1領域以外でも促進するかどうか、またどのような神経性nACh受容体に作用するのかわかるかどうか、その他の向知性薬、例えばピラセタムやアニラセタムが海馬神経伝達を促進するのかわかるかどうか、そしてもしそうであれば、ネフィラセタムと同じメカニズムでその促進が引き起こされるのかわかるかどうか、について検討した。

## [材料と方法]

### 1. 集合電位 (PS) 記録

Wistarラット (6週から8週齢、雄) 脳からの海馬を分離し、その切片 (厚さ400 $\mu$ m) を作成した。PSは海馬切片の貫通枝 (perforant path) を刺激することにより顆粒細胞体層から場の電位として記録された。

### 2. 2電極電位固定記録

アフリカツメガエル卵母細胞にラット神経性nACh受容体サブユニット ( $\alpha 3, \alpha 4, \beta 2, \beta 4, \alpha 7$ ) mRNA、あるいはグルタミン酸受容体 (AMPA受容体) サブユニット (GluR1, 2, 3) mRNAを注入し、卵母細胞膜上に様々な神経性nACh受容体あるいはAMPA受容体を発現させた。mRNA注入の2-7日後にtwo-electrode voltage-clamp法 (卵母細胞に2本の微小電極を刺し、細胞の膜電位を固定することによって細胞膜におけるイオン [電流] を測定する膜電位固定法) を用いて受容体チャネル全細胞膜電流を記録した。

## [結果]

### (実験1) 海馬神経伝達に対するネフィラセタムの濃度依存性効果

海馬神経伝達に対するネフィラセタム (1 nM~1  $\mu$ Mの濃度) の効果を検討した。ネフィラセタムは10分間、海馬切片に投与され、その後人工脳脊髄液で洗浄された。低濃度のネフィラセタム (1 nM) 処理において、PS電位振幅はその投与中に基準値の約90%にまで減少し、その後の洗浄にて元のレベルにまで回復した。10 nMネフィラセタムでは短期のPS電位振幅減衰 (約70%) に続いて、約140%の増大作用が認められた。高濃度ネフィラセタム ( $\geq 100$  nM) では、PS電位振幅は減衰なしに徐々に増大した。より著明な増大効果が1  $\mu$ Mネフィラセタムで得られ (基準値の約250%)、その効果は薬剤洗浄後1時間に渡って認められた。

## (実験2) ネフィラセタムの海馬神経伝達促進作用に対する $\alpha$ -ブンガロトキシンとメカミラミンの効果

ネフィラセタムの海馬神経伝達促進作用は神経nACh受容体拮抗薬 ( $\alpha$ -ブンガロトキシン: 選択的 $\alpha 7$ 受容体拮抗剤、メカミラミン: 非選択的神経nACh受容体拮抗薬) で抑制された。

## (実験3) 海馬神経伝達におけるピラセタムとアニラセタムの効果

海馬神経伝達に対するピラセタムとアニラセタムの効果を検討した。ネフィラセタムと同様に、ピラセタム (1  $\mu$ M) とアニラセタム (1  $\mu$ M) はともにPS電位振幅を増大させたが、続くネフィラセタム (1  $\mu$ M) の処理により更なるPS電位振幅の増大が認められた。

## (実験4) ピラセタムとアニラセタムの海馬神経伝達促進作用に対する $\alpha$ -ブンガロトキシンとメカミラミンの効果

ピラセタムとアニラセタムの海馬神経伝達促進作用は $\alpha$ -ブンガロトキシンとメカミラミンによって抑制されなかった。

## (実験5) 発現神経nACh受容体に対するネフィラセタムの効果

ネフィラセタム (1  $\mu$ M) は神経nACh受容体反応を様々のレベルに増強した (10分間の処置後20分で、 $\alpha 3\beta 2$ 受容体、 $127 \pm 10\%$ ;  $\alpha 3\beta 4$ 受容体、 $124 \pm 21\%$ ;  $\alpha 4\beta 2$ 受容体、 $129 \pm 13\%$ ;  $\alpha 4\beta 4$ 受容体、 $112 \pm 12\%$ ;  $\alpha 7$ 受容体、 $178 \pm 5\%$ )。これに対し、ピラセタムとアニラセタムは $\alpha 7$ 受容体反応に対して全く影響しなかった。

## (実験6) 発現AMPA受容体に対するネフィラセタムの効果

アニラセタムはAMPA受容体の脱感作時間を延長することが示されている。本研究でも、アニラセタム (1  $\mu$ M) はAMPA受容体 (GluR1,2,3) 電流減衰時間を延長したが、ネフィラセタム (1  $\mu$ M) とピラセタム (1  $\mu$ M) はAMPA受容体反応に対して影響しなかった。

## [考察]

(実験1) の結果により、ネフィラセタムはCA1領域の場合と同様に、海馬歯状回の神経伝達を濃度依存性に長期間、促進すること、が明らかとなった。

(実験2) で、ネフィラセタムの海馬神経伝達促進作用は神経nACh受容体拮抗薬によって抑制された。この結果は、nACh受容体がネフィラセタムの海馬神経伝達促進作用に関与する、という考えを支持するものである。

(実験3) で、ピラセタムとアニラセタムにも、海馬神経伝達促進作用が認められたが、この作用はネフィラセタムによって更に増強された。この結果は、これらの薬剤がネフィラセタムとは異なった作用機序によって海馬神経伝達を促進する、ことを示唆している。

(実験4) で、ピラセタムとアニラセタムの海馬神経伝達促進作用は、ネフィラセタムとは異なり、神経nACh受容体拮抗薬で抑制されなかった。この結果は、これらの薬剤がネフィラセタムとは異なった作用機序によって海馬神経伝達を促進する、という考えを更

に支持している。

(実験5)で、ネフィラセタムは神経nACh受容体反応を増強した。今回検討した神経nACh受容体の中で、ネフィラセタムは $\alpha 7$ 受容体反応を最も増強させた。この結果は、 $\alpha 7$ と $\alpha 4\beta 2$ 受容体が脳で発現している神経nACh受容体の大半を占めているという事実を考慮すれば、ネフィラセタムの海馬神経伝達促進作用において $\alpha 7$ 受容体がネフィラセタムの機能的な標的である、という可能性を示唆している。脳のnACh受容体は優位にシナプス前終末に存在し、伝達物質放出に関与していることが知られている。従って、ネフィラセタムは、シナプス前終末nACh受容体反応を増強することにより、グルタミン酸放出を増大させ、その結果シナプス伝達を促進する、のかもしれない。

(実験6)で、アニラセタムはAMPA受容体チャネルの特性修飾作用を認めたが、ネフィラセタムもピラセタムは何ら影響を与えなかった。この結果は、ネフィラセタムの作用部位が、アニラセタムそしておそらくピラセタムの作用部位とは異なっている、という事を示唆してる。

今回の研究の結果から、ネフィラセタムが神経nACh受容体を標的として海馬歯状回の神経伝達を長時間促進すること、が示された。他の向知性薬、ピラセタムやアニラセタムも海馬神経伝達促進作用を示したが、ネフィラセタムとは異なる作用機序によると推察できた。ネフィラセタムを含めたピロリドン誘導体の向知性薬としての作用機序は確定されていないが、これらの薬剤によるLTP様海馬神経伝達促進作用は認知改善を意味しているのかもしれない。

論文審査の結果の要旨												
受付番号	乙 第 1750 号	氏 名	野村 保									
論文題目	<p>Nefiracetam facilitates hippocampal neurotransmission by a mechanism independent of the piracetam and aniracetam action</p> <p>ネフィラセタムはピラセタム及びアニラセタムとは異なる作用機序によって海馬神経伝達を増強する</p>											
審査委員	<table border="0"> <tr> <td>主 査</td> <td>伊 東</td> <td>宏</td> </tr> <tr> <td>副 査</td> <td>佐 野</td> <td>公 昭</td> </tr> <tr> <td>副 査</td> <td>前 田</td> <td>盛</td> </tr> </table>			主 査	伊 東	宏	副 査	佐 野	公 昭	副 査	前 田	盛
主 査	伊 東	宏										
副 査	佐 野	公 昭										
副 査	前 田	盛										
審査終了日	平成 12 年 7 月 26 日											

（要旨は1,000字～2,000字程度）

中枢神経系におけるニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体は、記憶や学習機能に大きな役割を果たし、加えて痴呆患者の脳内では、その数が著明に減少していることが報告されている。ピロリドン誘導体の一つであるネフィラセタムは向知性薬として開発されてきた薬剤であるが、その作用機序として、このnACh受容体を標的にしていることが示唆されている。先に我々は、海馬CA1シナプス伝達において、ネフィラセタムがnACh受容体を介して、学習・記憶と関連する長期増強現象 (LTP) 様効果を引き起こすことを報告している (参考論文)。今回の研究で我々は、ネフィラセタムが海馬神経伝達をCA1領域以外でも促進するかどうか、またどのような神経性nACh受容体に作用するのかわかるかどうか、その他の向知性薬、例えばピラセタムやアニラセタムが海馬神経伝達を促進するのかわかるかどうか、そしてもしそうであれば、ネフィラセタムと同じメカニズムでその促進が引き起こされるのかわかるかどうか、について検討した。

#### (実験1) 海馬神経伝達に対するネフィラセタムの濃度依存性効果

海馬神経伝達に対するネフィラセタム (1 nM~1  $\mu$ Mの濃度) の効果を検討した。ネフィラセタムは10分間、海馬切片に投与され、その後人工脳脊髄液で洗浄された。低濃度のネフィラセタム (1 nM) 処理において、PS電位振幅はその投与中に基準値の約90%にまで減少し、その後の洗浄にて元のレベルにまで回復した。10 nMネフィラセタムでは短期のPS電位振幅減衰 (約70%) に続いて、約140%の増大作用が認められた。高濃度ネフィラセタム ( $\geq 100$  nM) では、PS電位振幅は減衰なしに徐々に増大した。より著明な増大効果が1  $\mu$ Mネフィラセタムで得られ (基準値の約250%)、その効果は薬剤洗浄後1時間に渡って認められた。

(実験1) の結果により、ネフィラセタムはCA1領域の場合と同様に、海馬歯状回の神経伝達を濃度依存性に長期間、促進すること、が明らかとなった。

#### (実験2) ネフィラセタムの海馬神経伝達促進作用に対する $\alpha$ -ブンガロトキシンとメカミラミンの効果

ネフィラセタムの海馬神経伝達促進作用は神経nACh受容体拮抗薬 ( $\alpha$ -ブンガロトキシン: 選択的 $\alpha 7$ 受容体拮抗剤、メカミラミン: 非選択的神経nACh受容体拮抗薬) で抑制された。

(実験2) で、ネフィラセタムの海馬神経伝達促進作用は神経nACh受容体拮抗薬によって抑制された。この結果は、nACh受容体がネフィラセタムの海馬神経伝達促進作用に関与する、という考えを支持するものである。

#### (実験3) 海馬神経伝達におけるピラセタムとアニラセタムの効果

海馬神経伝達に対するピラセタムとアニラセタムの効果を検討した。ネフィラセタムと同様に、ピラセタム (1  $\mu$ M) とアニラセタム (1  $\mu$ M) はともにPS電位振幅を増大させたが、続くネフィラセタム (1  $\mu$ M) の処理により更なるPS電位振幅の増大が認められた。

(実験3) で、ピラセタムとアニラセタムにも、海馬神経伝達促進作用が認められたが、この作用はネフィラセタムによって更に増強された。この結果は、これらの薬剤がネフィラセタムとは異なった作用機序によって海馬神経伝達を促進する、ことを示唆している。

#### (実験4) ピラセタムとアニラセタムの海馬神経伝達促進作用に対する $\alpha$ -ブンガロトキシンとメカミラミンの効果

ピラセタムとアニラセタムの海馬神経伝達促進作用は $\alpha$ -ブンガロトキシンとメカミラミンによって抑制されなかった。

(実験4)で、ピラセタムとアニラセタムの海馬神経伝達促進作用は、ネフィラセタムとは異なり、神経nACh受容体拮抗薬で抑制されなかった。この結果は、これらの薬剤がネフィラセタムとは異なった作用機序によって海馬神経伝達を促進する、という考えを更に支持している。

#### (実験5) 発現神経nACh受容体に対するネフィラセタムの効果

ネフィラセタム(1  $\mu$ M)は神経nACh受容体反応を様々のレベルに増強した(10分間の処置後20分で、 $\alpha 3\beta 2$ 受容体、 $127 \pm 10\%$ ;  $\alpha 3\beta 4$ 受容体、 $124 \pm 21\%$ ;  $\alpha 4\beta 2$ 受容体、 $129 \pm 13\%$ ;  $\alpha 4\beta 4$ 受容体、 $112 \pm 12\%$ ;  $\alpha 7$ 受容体、 $178 \pm 5\%$ )。これに対し、ピラセタムとアニラセタムは $\alpha 7$ 受容体反応に対して全く影響しなかった。

(実験5)で、ネフィラセタムは神経nACh受容体反応を増強した。今回検討した神経nACh受容体の中で、ネフィラセタムは $\alpha 7$ 受容体反応を最も増強させた。この結果は、 $\alpha 7$ と $\alpha 4\beta 2$ 受容体が脳で発現している神経nACh受容体の大半を占めているという事実を考慮すれば、ネフィラセタムの海馬神経伝達促進作用において $\alpha 7$ 受容体がネフィラセタムの機能的な標的である、という可能性を示唆している。脳のnACh受容体は優位にシナプス終末に存在し、伝達物質放出に関与していることが知られている。従って、ネフィラセタムは、シナプス前終末nACh受容体反応を増強することにより、グルタミン酸放出を増大させ、その結果シナプス伝達を促進する、のかもしれない。

#### (実験6) 発現AMPA受容体に対するネフィラセタムの効果

アニラセタムはAMPA受容体の脱感作時間を延長することが示されている。本研究でも、アニラセタム(1  $\mu$ M)はAMPA受容体(GluR1,2,3)電流減衰時間を延長したが、ネフィラセタム(1  $\mu$ M)とピラセタム(1  $\mu$ M)はAMPA受容体反応に対して影響しなかった。

(実験6)で、アニラセタムはAMPA受容体チャネルの特性修飾作用を認めたが、ネフィラセタムもピラセタムは何ら影響を与えなかった。この結果は、ネフィラセタムの作用部位が、アニラセタムそしておそらくピラセタムの作用部位とは異なっている、という事を示唆してる。

今回の研究の結果から、ネフィラセタムが神経nACh受容体を標的として海馬歯状回の神経伝達を長時間促進すること、が示された。他の向知性薬、ピラセタムやアニラセタムも海馬神経伝達促進作用を示したが、ネフィラセタムとは異なる作用機序によると推察できた。ネフィラセタムを含めたピロリドン誘導体の向知性薬としての作用機序は確定されていないが、これらの薬剤によるLTP様海馬神経伝達促進作用は認知改善を意味しているのかもしれない。

本研究は向知性薬の一つであるネフィラセタムのメカニズムをピラセタムやアニラセタムとの関係で研究したもので価値ある集積と考えられ(医学)博士の学位を得る資格があるものとする。