

新規認知症治療薬候補ベンゾジアゼピン受容体
パーシャルインバーサゴニスト AC-3933 の
薬理学的特性

2017 年

大日本住友製薬(株) 創薬開発研究所

橋本 孝志

目次

略号表	4
使用薬物一覧.....	5
緒言	6
第1章 AC-3933 のベンゾジアゼピン受容体インバーシアゴニストとしての特性	8
1. 実験材料と実験方法.....	10
1-1 使用動物	10
1-2 使用薬物	10
1-3 ベンゾジアゼピン受容体結合試験.....	10
1-4 各種受容体および酵素（オプターゲット）に関する検討.....	11
1-5 [³⁵ S]TBPS 結合試験	11
1-6 ラット海馬切片における高 K ⁺ 誘発アセチルコリン遊離増強作用	12
1-7 ラット海馬スライス集合電位の長期増強（LTP）増大作用	13
1-8 統計解析	14
2. 実験結果.....	14
2-1 ベンゾジアゼピン受容体結合試験.....	14
2-2 各種受容体および酵素（オプターゲット）に関する検討.....	15
2-3 [³⁵ S]TBPS 結合試験	17
2-4 ラット海馬切片における高 K ⁺ 誘発アセチルコリン遊離増強作用	18
2-5 ラット海馬スライス集合電位の長期増強（LTP）増大作用	19
3. 考察.....	20
第2章 AC-3933 の認知機能障害改善薬としての特性	22
1. 実験材料と実験方法.....	23
1-1 使用動物	23
1-2 使用薬物	23
1-3 無拘束ラットにおける脳波賦活作用.....	23
1-4 無拘束ラット海馬におけるアセチルコリン遊離促進作用.....	24
1-5 Y字型迷路試験	25
1-6 物体位置記憶試験	25
1-7 老齢マウスにおける認知機能増強作用.....	26
1-7-1 Y字型迷路試験	26
1-7-2 物体認識試験	26
1-8 統計解析	27
2. 実験結果.....	29
2-1 無拘束ラットにおける脳波賦活作用.....	29
2-2 無拘束ラット海馬におけるアセチルコリン遊離促進作用.....	31
2-3 スコポラミン誘発記憶障害改善作用.....	32
2-3-1 ラット Y字型迷路試験	32

2-3-2	マウス Y 字型迷路試験	33
2-3-3	Donepezil との併用効果 (Y 字型迷路試験)	35
2-4	MK-801 誘発記憶障害改善作用	36
2-4-1	マウス Y 字型迷路試験	36
2-4-2	マウス物体位置記憶試験	37
2-5	老齢マウスにおける認知機能増強作用	40
2-5-1	老齢マウス Y 字型迷路試験	40
2-5-2	老齢マウス新奇物体認識試験	40
3.	考察	42
第 3 章	AC-3933 の認知機能障害改善作用機序に関する検討	45
1.	実験材料と実験方法	45
1-1	使用動物	45
1-2	使用薬物	45
1-3	Y 字型迷路試験	45
1-4	物体位置記憶試験	46
1-5	統計解析	46
2.	実験結果	47
2-1	Scopolamine 誘発記憶障害改善作用機序	47
2-2	MK-801 誘発記憶障害改善作用機序	48
2-2-1	Y 字型迷路試験	48
2-2-2	物体位置記憶試験	49
2-3	AC-3933 の記憶障害改善作用発現時間の比較	50
第 4 章	ベンゾジアゼピン受容体インバースアゴニスト作用による副作用に関する検討	53
1.	実験材料と実験方法	53
1-1	使用動物	53
1-2	使用薬物	53
1-3	In vivo 受容体結合試験	54
1-4	痙攣惹起試験	54
1-5	高架式十字迷路試験	54
1-6	統計解析	55
2.	実験結果	56
2-1	In vivo 受容体結合試験	56
2-2	痙攣惹起試験	56
2-3	高架式十字迷路試験	57
3.	考察	59
総括	60
謝辞	63
参考文献	64

略号表

A/D	analog/digital
AC-3933	5-(3-methoxyphenyl)-3-(5-methyl-1, 2, 4-oxadiazol-3-yl)-1, 6-naphthyridin-2(1 <i>H</i>)-one
ACh	acetylcholine
AChE	acetylcholinesterase
ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AUC	area under the concentration-time curve
B/F	bound/free
BZR	benzodiazepine receptor
CA1	Cornet d'Ammon 1
CCK	cholecystokinin
ChAT	choline acetyltransferase
DI	discrimination index
DMSO	dimethylsulfoxide
DO	displaced object
EDTA2Na	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, disodium salt
EEG	electroencephalogram
fMRI	functional magnetic resonance imaging
GABA	γ -aminobutyric acid
Glu	glutamic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
Hz	hertz
i.g.	intragastrically
IP3	inositol trisphosphate
i.v.	intravenously
K ⁺	potassium ion
K _d	dissociation constant
K _i	inhibition constant
LTP	long-term potentiation
NDO	non-displaced object
NE transporter	norepinephrine transporter
NMDA	N-methyl-D-aspartate
p.o.	per os
PS	population spike
RI	radioisotope
s.c.	subcutaneously
SEM	standard error of the mean
TBPS	tert-butylbicyclophosphorothionate
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

使用薬物一覧

(-)-Scopolamine hydrobromide (ムスカリン様アセチルコリン受容体アンタゴニスト)	(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>S</i>)-6,7-epoxytropan-3-yl (2 <i>S</i>)-3-hydroxy-2-phenylpropanoate hydrobromide
(+)-Bicuculline (GABA _A 受容体アンタゴニスト)	[<i>R</i> -(<i>R</i> [*] , <i>S</i> [*])]-6-(5,6,7,8-tetrahydro-6-methyl-1,3-dioxolo[4,5- <i>g</i>]isoquinolin-5-yl)furo[3,4- <i>e</i>]-1,3-benzodioxol-8(6 <i>H</i>)-one
(+)-MK-801 hydrogen maleate (NMDA受容体アンタゴニスト)	(5 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>a,d</i>]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate
Clonazepam (ベンゾジアゼピン受容体アゴニスト)	5-(2-chlorophenyl)-7-nitro-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-2-one
Diazepam (ベンゾジアゼピン受容体アゴニスト)	7-chloro-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-2-one
Donepezil (アセチルコリンエステラーゼ阻害薬)	(2 <i>RS</i>)-2-[(1-benzylpiperidin-4-yl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-one monohydrochloride
FG-7142 (ベンゾジアゼピン受容体インバーサアゴニスト)	<i>N</i> -methyl-β-carboline-3-carboxamide
Flumazenil (ベンゾジアゼピン受容体アンタゴニスト)	ethyl 8-fluoro-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-4 <i>H</i> -imidazo[1,5- <i>a</i>][1,4]benzodiazepine-3-carboxylate
Flunitrazepam (ベンゾジアゼピン受容体アゴニスト)	5-(2-fluorophenyl)-1-methyl-7-nitro-3 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-2(1 <i>H</i>)-one
Galantamine (アセチルコリンエステラーゼ阻害薬)	(4 <i>aS</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i>)-4 <i>a</i> ,5,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-11-methyl-6 <i>H</i> -benzofuro[3 <i>a</i> ,3,2- <i>ef</i>][2]benzazepin-6-ol monohydrobromide
Memantine (NMDA受容体アンタゴニスト)	3,5-dimethyltricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dec-1-ylamine monohydrochloride
Physostigmine (アセチルコリンエステラーゼ阻害薬)	[(3 <i>aR</i> ,8 <i>bS</i>)-3,4,8 <i>b</i> -trimethyl-2,3 <i>a</i> -dihydro-1 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>b</i>]indol-7-yl] <i>N</i> -methylcarbamate
Picrotoxin (GABA _A 受容体アンタゴニスト)	(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i>)-1-hydroxy-14-(2-hydroxypropan-2-yl)-13-methyl-4,7,10-trioxapentacyclo[6.4.1.1 ^{9,12} .0 ^{3,5} .0 ^{5,13}]tetradecane-6,11-dione; (1 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i>)-1-hydroxy-13-methyl-14-(prop-1-en-2-yl)-4,7,10-trioxapentacyclo[6.4.1.1 ^{9,12} .0 ^{3,5} .0 ^{5,13}]tetradecane-6,11-dione
Rivastigmine (アセチルコリンエステラーゼ阻害剤)	3[(1 <i>S</i>)-1-(dimethylamino)ethyl]phenyl <i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -methylcarbamate
β-CCM (ベンゾジアゼピン受容体インバーサアゴニスト)	methyl β-carboline-3-carboxylate

緒言

近年、先進国では急速な高齢化に伴い認知症と診断される老人の数も増加の一途をたどり、社会的にも大きな問題となっている。中でも、アルツハイマー病は認知症患者の内60～70%を占めるとされ、今後も患者数は増加すると予測されている¹⁾。

アルツハイマー病は記憶障害をはじめとする認知機能障害を中核症状とする進行性の神経変性疾患であり、老人斑の沈着と神経原線維変化の出現、および神経細胞の萎縮、脱落を病理学的特徴とする^{2,3,4,5)}。老人斑は β -アミロイド蛋白から構成され、神経原線維変化は異常にリン酸化されたタウ蛋白に起因する^{6,7,8)}。これらがアルツハイマー病発症に密接に関与するとの研究は多く、特に β -アミロイド原因説(アミロイド仮説)に基づいた原因療法のための治療薬の研究が色々と進められているが、未だ上市に至った薬剤はない。一方、成因論とは別にアルツハイマー病の認知機能障害の原因としての神経伝達物質が研究されており、アルツハイマー病患者の認知機能障害と脳内アセチルコリン(ACh)神経系の機能低下との間に密接な関係があることが見出されてきた(コリン仮説)^{9,10)}。この仮説に基づき、脳内ACh神経系を賦活化する剤としてアセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害薬である tacrine が臨床開発された¹¹⁾。現在、同種薬剤である donepezil、rivastigmine、galantamine が各国で承認されており^{12, 13, 14)}、また、神経保護効果が報告されている N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬 memantine も臨床使用されている¹⁵⁾。これらの治療薬は、一時的な認知機能の改善をもたらすが、改善の程度、効果の持続性ならびに副作用面で課題を残しており、全く異なった作用機序を持つ新たな治療薬の登場が強く待ち望まれている。

γ -Aminobutyric acid (GABA) は脳内において神経の活性を抑制的に調節する神経伝達物質であり、各種神経伝達物質の遊離抑制(例えば海馬におけるACh遊離抑制など)に関与する^{16, 44, 45)}。脳内においてはGABA_A受容体とGABA_B受容体の2つの受容体サブタイプが知られている¹⁷⁾。この内、イオンチャネル型のGABA_A受容体にはベンゾジアゼピン系化合物の受容体があり、ベンゾジアゼピン系化合物によってGABAによるイオンチャネルの開口はアロステリックに調節を受ける^{18, 19, 20)}。例えば、ベンゾジアゼピン受容体(BZR)アゴニストはGABA神経の活動性を増強するため、抗不安薬、抗痙攣薬あるいは睡眠導入薬として広く用いられている^{21, 22, 23)}。一方、BZRインバーサアゴニストはGABA神経の抑制的な神経支配を抑制し、ACh神経を含めた各種神経系を賦活化する²⁸⁾。

我々は、非ベンゾジアゼピン系睡眠導入薬の創薬研究の中からBZRアゴニストとは逆に神経の興奮性を高める作用を有するBZRインバーサアゴニストを見出した。それら

ロトタイプから構造変換を重ねた結果、 β -カルボリン骨格を持たない、これまでの BZR インバースアゴニストとは性質の異なる新規化合物 5-(3-methoxyphenyl)-3-(5-methyl-1, 2, 4-oxadiazol-3-yl)-1, 6-naphthyridin-2(1H)-one (AC-3933) を見出すに至った (Fig. 1)。本研究では、AC-3933 の薬理学的特性を明らかにし、認知症治療薬としての可能性について検討した。

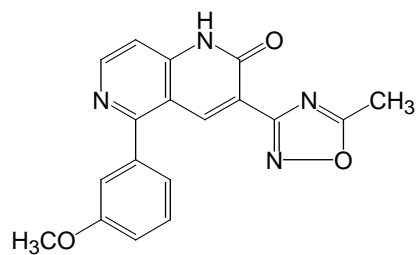


Fig. 1. Chemical structure of 5-(3-methoxyphenyl)-3-(5-methyl-1, 2, 4-oxadiazol-3-yl)-1, 6-naphthyridin-2(1H)-one (AC-3933) .

第1章 AC-3933のベンゾジアゼピン受容体インバースアゴニストとしての特性

GABA_A受容体は、2つの α および β サブユニットと1つの γ サブユニットからなる5量体の受容体で、中央にクロライドイオンチャンネルを有している^{16, 24}。GABAによるGABA_A受容体の刺激によりクロライドイオンチャンネルが開き、神経細胞が過分極して興奮が抑制される。ベンゾジアゼピン系化合物はGABA_A受容体/イオンチャンネル複合体のGABA結合部位とは異なる部位に結合し (Fig. 2)、GABA刺激によるクロライドイオンチャンネルの開口をアロステリックに調節する^{18, 19, 24, 20}。このため、ベンゾジアゼピン受容体 (BZR) リガンドはGABAの作用を強めるアゴニスト、GABAの作用を弱めるインバースアゴニスト、そしてGABAの作用に影響をおよぼさないアンタゴニストの3タイプに分類され、さらに化合物の固有活性の程度によりパーシャルアゴニスト、パーシャルインバースアゴニストとして細分化される^{25, 26} (Fig. 3)。

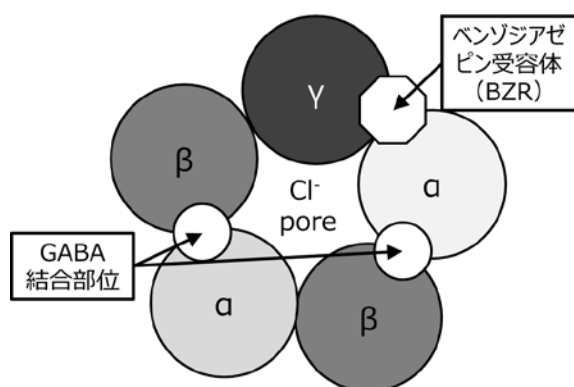


Fig. 2 Schematic model of the GABA_A receptor complex

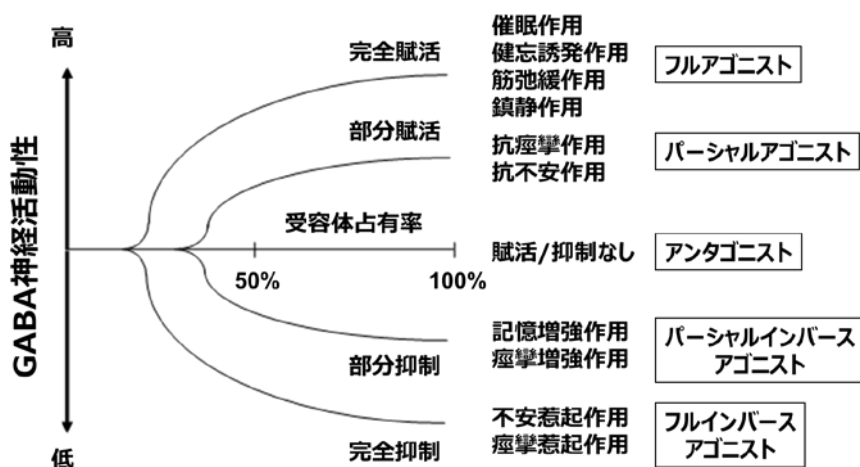


Fig. 3. Allosteric modulation of GABA_A receptors by benzodiazepine receptor ligands

BZR インバーシアゴニストは、GABA 神経系の機能を抑制することにより間接的に様々な神経系を活性化させる。なかでもアセチルコリン (ACh) 神経系に対する活性化作用は、認知機能を亢進させることが知られている^{27, 28, 29)}。一方で、GABA 神経系の過度の抑制に起因する副作用としての痙攣惹起作用や不安惹起作用が予想され^{30, 90)}、これらの副作用を軽減するためには、受容体親和性は高いがインバーシアゴニストとしての固有活性が低いパーシャルインバーシアゴニストが望ましい。そこで、第 1 章では *in vitro* 試験により、新規ナフチリジン誘導体 5-(3-methoxyphenyl)-3-(5-methyl-1, 2, 4-oxadiazol-3-yl)-1, 6-naphthyridin-2(1*H*)-one (AC-3933) が BZR パーシャルインバーシアゴニストであることを明らかにし、記憶増強作用の可能性について評価した。

まず、AC-3933 の BZR に対する親和性を明らかにするために、^[3H]flumazenil を用いた BZR 結合試験を行い、結合阻害定数を算出した。同時に、BZR リガンドとしてどのような固有活性を有しているのかを知るため、GABA の非存在/存在条件での結合阻害定数の比 (GABA 比) を求めた。また、AC-3933 が BZR 特異的リガンドであることを明らかにするため、オフターゲット探索を行った。加えて、AC-3933 の BZR インバーシアゴニストとしての作用特性を明らかにするため、クロライドイオン取り込み試験に代わって汎用されている^[35S]tert-butylbicyclophosphorothionate (^[35S]TBPS) 結合試験を用いて AC-3933 の機能性評価を行った。

認知機能に重要な役割を果たす ACh 神経系は、GABA による抑制的制御を受けている^{44, 45, 46)}。そこで、AC-3933 により ACh 神経系が賦活化されるかについて明らかにするため、海馬切片における高 K⁺刺激による ACh 遊離に対する AC-3933 の増強効果について検討した。さらに AC-3933 が生体において記憶形成を促進する可能性を評価するため、シナプスレベルでの記憶形成モデルとして知られる長期増強 (long-term potentiation; LTP) 現象⁴⁶⁾に対する AC-3933 の増強効果について電気生理学的手法により検討した。

1. 実験材料と実験方法

本章における動物を用いた試験は、すべて大日本住友製薬株式会社 研究本部動物実験委員会による承認を受け、実験動物取扱ガイドラインに従って実施した。

1-1 使用動物

雄性 Wistar ラット (200-350 g) (日本エスエルシー) を用いた。動物は、紙性床敷きを敷き詰めたプラスチック製のケージに 2-3 匹ずつ収容され、照明 (午前 7 時から午後 7 時まで点灯)、室温 ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$)、湿度 ($55 \pm 15\%$) で自動管理された動物室にて飼育された。動物は、エサ (CE-2, 日本クレア) および水を自由に摂取できるようにした。入荷後、7 日以上 の馴化期間をおき、その後実験に用いた。

1-2 使用薬物

試験に用いた薬物のうち、重要な化合物については以下に示す供給元より入手した。AC-3933 (大日本住友製薬 (株) 化学研究所にて合成)、diazepam および clonazepam (和光純薬工業)、methyl β -carboline-3-carboxylate (β -CCM)、flumazenil、GABA、(+)-bicuculline (bicuculline) および picrotoxin (Sigma-Aldrich)、 $[^{35}\text{S}]\text{TBPS}$ および $[^3\text{H}]\text{flumazenil}$ (PerkinElmer Life Science Inc.)。その他の化合物は一般的な市販品を購入した。

被験物質は、dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し、その後目的の濃度まで脱イオン水を用いて希釈した。すべての試験において含まれる DMSO の濃度は 0.1% 以下であった。Clonazepam および bicuculline は、それぞれ ethanol および 1 N HCl に溶解し、15 mM Krebs-Tris 緩衝液 (pH 7.4) を用いて希釈した。

1-3 ベンゾジアゼピン受容体結合試験

BZR 受容体結合試験は既報の方法に従って行った^{31, 32}。Wistar ラット (210–230 g) を断頭にて安楽死後、全脳をすばやく摘出した。10 倍量の氷冷 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.7) 中でホモジナイズした。脳ホモジネートを 50,000 xg で 15 分間 (4°C) の遠心を行い、沈渣を得た。この後、10 倍量の氷冷 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.7) への懸濁と遠心を 2 回繰り返し、最終的に得られた沈渣を -80°C にて凍結保存した。翌日、凍結融解した沈渣を 10 倍量の氷冷 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.7) に再懸濁、50,000 xg で 15 分間 (4°C) の遠心を 2 回行った。最終沈渣を氷冷 15 mM Krebs-Tris 緩衝液 ((in mM) NaCl (118)、KCl (4.8)、 CaCl_2 (1.28)、1.2 mM MgSO_4 (1.2)、Tris-HCl (15)、pH 7.4) にて 20 mL/g 組織湿重量の濃度になるよう懸濁し、実験に用いるまで -80°C で凍結保存した。タンパク定量は、BCA

タンパクアッセイキット (PIERCE) を用いて実施した。

受容体膜標品 (200 μ L)、 $[^3\text{H}]$ flumazenil (最終濃度 1 nM) および各濃度の被験物質を混合し、GABA 添加群 (最終濃度 100 μ M) と GABA 非添加群 (bicuculline 添加、最終濃度 10 μ M) の反応混合液 (全液量 1 mL) を調製した。これらを 25°C で 15 分間インキュベーションし、GF/B グラスマイクロファイバーフィルターをセットしたセルハーベスター装置 (MB-48, Brandel) を用いて減圧濾過により bound/free (B/F) 分離した。フィルターは氷冷 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.7) 5 mL で 3 回洗浄したのち、バイアルに入れ、液体シンチレーションカクテル (ACS II, Amersham) 10 mL を加えて振とうした後、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 3100TR, Packard) を用いて放射能活性を測定した。非特異的結合量算出のために非標識リガンドとして clonazepam (最終濃度 1 μ M) を用いた。

全結合量から非特異的結合量を差し引いて求めた特異的結合量を 100% として、被験物質の各濃度における阻害率を算出し、統計処理ソフトウェア SAS[®] System (SAS Institute Inc.) を用いての非線形最小 2 乗法により IC₅₀ 値を算出した。得られた IC₅₀ 値から以下の式を用いて結合阻害定数 (K_i) を求めた。

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d) \quad (K_d \text{ は解離定数、}[L] \text{ は } [^3\text{H}] \text{flumazenil の最終濃度})$$

K_d は $[^3\text{H}]$ flumazenil の飽和結合試験の結果より得られた値 (GABA 添加時, 3.40 nM; GABA 非添加時, 4.05 nM) を用いた。GABA 比は、GABA 存在下と非存在下での K_i 値 (nM) の比 (GABA (-) /GABA (+)) より算出した。

1-4 各種受容体および酵素 (オフターゲット) に関する検討

79 種類の受容体、5 種類のトランスポーター、および 7 種類のイオンチャネルに対する結合親和性ならびに 2 種類の酵素活性阻害効力の検討を積水メディカル株式会社 (東京) に依頼し実施した。結合試験には最終濃度 1 μ M の AC-3933、酵素試験には最終濃度 30 μ M の AC-3933 をそれぞれ用いた。

1-5 $[^{35}\text{S}]$ TBPS 結合試験

$[^{35}\text{S}]$ TBPS 結合試験は Serra ら³³⁾の方法に従い行った。Wistar ラット (230-250 g) を断頭にて安楽死後、全脳をすばやく摘出し、氷冷したプレート上にて大脳皮質を採取した。50 倍量の氷冷 50 mM Tris-citrate 緩衝液 (100 mM NaCl 含む) (pH 7.4) 中でホモジナイズ

した。脳ホモジネートを 20,000 xg で 20 分間 (4°C) 2 回の遠心を行い、沈渣を得た。この沈渣は -80°C にて一晩凍結保存した。翌日、凍結融解した沈渣を 50 倍量の氷冷 50 mM Tris-citrate 緩衝液 (100 mM NaCl 含む) (pH 7.4) に再懸濁し、20,000 xg で 20 分間 (4°C) 遠心した。最終的に得られた沈渣を 20 mg 湿重量/mL の濃度になるように Tris-citrate 緩衝液 (pH 7.4) で懸濁し、 $[^{35}\text{S}]\text{TBPS}$ 結合試験に用いた。

受容体膜標品 (200 μL)、 $[^{35}\text{S}]\text{TBPS}$ (最終濃度 2 nM)、NaCl (200 mM)、GABA (1 μM) および各濃度の被験物質を混合し、反応混合液 (全液量 1 mL) を調製した。これらを 25°C で 90 分間インキュベーションし、0.1% polyethyleneimine で前処置した GF/B グラスマイクロファイバーフィルターをセットしたセルハーベスター装置 (MB-48, Brandel) を用いて減圧濾過により B/F 分離した。フィルターは氷冷 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 5 mL で 3 回洗浄したのち、バイアルに入れ、液体シンチレーションカクテル (ACS II, Amersham) 10 mL を加えて振とうした後、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 3100TR, Packard) を用いて放射活性を測定した。非特異的結合の算出には、100 μM picrotoxin 存在下でのアッセイで得られたデータを用いた。

全結合量から非特異的結合量を差し引いて求めた $[^{35}\text{S}]\text{TBPS}$ の特異的結合量を 100% とし、各濃度の被験物質存在下での特異的 $[^{35}\text{S}]\text{TBPS}$ 結合量の割合を求め、% of control として表した。

1-6 ラット海馬切片における高 K^+ 誘発アセチルコリン遊離増強作用

ラット海馬切片を用いた ACh 遊離実験は、既報の方法に若干改変を加えて実施した^{34, 35)}。Wistar ラット (300-350 g) を断頭により安楽死させ、すばやく脳を摘出後、酸素飽和の氷冷灌流液 (100 μM physostigmine と 2 μM choline chloride を含む Krebs 緩衝液 (in mM) NaCl (124)、KCl (3)、 KH_2PO_4 (1.25)、 MgSO_4 (1)、 CaCl_2 (2)、 NaHCO_3 (26)、glucose (10)、pH 7.4) に浸漬した。マイクロスライサー (DTK-1000, Dosaka EM) を用いて海馬切片 (厚さ 400 μm) を作製し、灌流試験開始前に 37°C 酸素飽和灌流液中に 60 分間静置した。その後、灌流実験装置 (SF-12, Superfusion 1000, Brandel) へ海馬切片をセットし、37°C 酸素飽和灌流液を 60 分間灌流させた (流速 1.0 mL/min)。安定化後、37°C 酸素飽和高 K^+ -Krebs 緩衝液 (25 mM KCl 含有) で 50 分間刺激を与えた。刺激中の灌流液のうち、後半 30 分を AC-3933 未処置フェーズ (S1) として採取した。再び 37°C 酸素飽和灌流液へ変え、刺激後の海馬切片を安定化させるために 50 分間灌流させた。その後、AC-3933 もしくは溶媒を含む 37°C 酸素飽和高 K^+ -Krebs 緩衝液 (25 mM KCl 含有) で 70 分間刺激を与えた。この刺激中の 30 分から 40 分の間と 60 分から 70 分の間計 20 分間の灌流液を

AC-3933 処置フェーズ (S2) として採取した。灌流液 S1 および S2 は ACh 定量時まで 4°C にて保存した。

灌流液 S1 および S2 中の ACh 量の定量は、逆相カラム (AC-GEL、Eicom) および酵素カラム (アセチルコリンエステラーゼ/コリンオキシダーゼ固相化カラム、Eicom) が繋がれた電気化学検出器 (ECD-300、Eicom) を備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて実施した。作用電極には白金電極 (WE-PT、Eicom) を用い、適用電圧は 450 mV とした。移動相は、1-decansulfonate (375 mg/L) および EDTA 2Na (5 mg/L) を含む 50 mM pyrophosphoric acid (pH 8.2) を用い、流速は 0.15 mL/min とした。各灌流液 10 μ L に isopropylhemicholine (1 pmol) を内部標準として添加し、HPLC システムへ注入した。

コントロール群 (溶媒処置群) における S2/S1 の値を 100%として、AC-3933 処置時の S2/S1 の割合を算出し、ACh 遊離増強作用を評価した。

1-7 ラット海馬スライス集合電位の長期増強 (LTP) 増大作用

Kawasaki ら³⁶⁾の方法に準じて行った。Wistar ラット (200-230 g) を断頭により安楽死させ、すばやく脳を摘出し、酸素飽和の氷冷の人口脳脊髄液 (ACSF) (124 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 2.4 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glucose) 中に 5 分間浸した。矢状断方向に厚さ 400 μ m の海馬切片をマイクロスライサー (DTK-3000、Dosaka EM) を用いて作成し、切片は室温にて少なくとも 2 時間酸素飽和 ACSF を満たしたインキュベーションチャンバー内に静置した。その後、切片をインターフェース記録チャンバー (BSC-BU/HT、Medical Systmes Corp.) 内へ移し、33 \pm 1°C の酸素飽和 ACSF を灌流させた (1.5 mL/min)。30 分後、刺激電極 (直径 50 μ m のステンレス製双極電極、2 電極間; 500 μ m) は海馬シャプファー側枝に、記録電極 (生理的食塩液を満たしたガラス電極、抵抗 4-10 M Ω) は海馬 CA1 野の錘体細胞層に刺入した。電気刺激装置 (SEN-7203、日本光電) を用いて 5 秒ごとに矩形波電位刺激を与え、誘発反応は微小電極増幅装置 (AXOCLAMP-2A、Axon Instruments Inc.) を用いて増幅した。記録開始前より矩形波電位刺激を最大反応 (8-14 mV) の半分の大きさの集合電位 (PS) を得られる強度に変更し、刺激の間隔を 15 秒に変えた。シャプファー側枝を刺激した際の CA1 野での PS が安定してから記録を開始した。記録は全体で 1 時間 (240 回) 行い、記録開始後 30 分の時点で、33Hz で 8 連発パルスのテタヌス刺激を与え LTP を誘導させた。記録開始後 10 分より AC-3933 または溶媒を含む ACSF に置換し、テタヌス刺激後 10 分まで被験物質を作用させた。

データは、pCLAMP6 software (Axon Instruments, Inc.) により集計解析した。AC-3933

(または溶媒) 処置前 10 分間の平均 PS 振幅を各切片のコントロール値、AC-3933 除去後 20 分間の平均 PS 振幅を LTP 値とし、コントロールに対する相対振幅を算出した。

1-8 統計解析

データは平均値と標準誤差 (SEM) で表記した。また、統計解析は SAS[®] System を用いて実施した。^[35S]TBPS 結合試験 ACh 遊離試験、および LTP 試験では、コントロール群と被験物質の各処置濃度群との間で Dunnett 型多重比較試験を用いて統計解析を行った。有意水準は両側 5% とした。

2. 実験結果

2-1 ベンゾジアゼピン受容体結合試験

AC-3933 は BZR に高い親和性を示し、GABA 非添加条件下での Ki 値は 5.15 ± 0.39 nM であった (Table 1)。固有活性を調べるため、GABA 添加時と非添加時の Ki 値の比 (GABA 比) を求めたところ、AC-3933 の GABA 比は 0.84 ± 0.03 であった。同じ試験において対照化合物として検討した β -CCM (BZR フルインバースアゴニスト) の GABA 比は 0.52 ± 0.04 、flumazenil (BZR アンタゴニスト) は 1.19 ± 0.05 、diazepam (BZR アゴニスト) は 3.59 ± 0.19 であった。

Table 1. Biochemical properties of AC-3933 and other BZR ligands

Compound	Ki (nM)		GABA ratio
	GABA(-)	GABA(+)	GABA(-)/GABA(+)
AC-3933	5.15 ± 0.39	6.11 ± 0.26	0.84 ± 0.03
β -CCM	5.97 ± 0.48	11.5 ± 1.10	0.52 ± 0.04
Flumazenil	5.10 ± 0.11	4.30 ± 0.08	1.19 ± 0.05
Diazepam	94.5 ± 6.90	26.3 ± 0.50	3.59 ± 0.19

Binding of [³H]flumazenil (1 nM) was performed by incubating crude membrane preparation of rat whole brain at 25°C for 15 min. Nonspecific binding was determined in the presence of clonazepam (1 μ M). Data are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments.

2-2 各種受容体および酵素（オフターゲット）に関する検討

AC-3933 は BZR を除いて、検討したすべての受容体、トランスポーターおよびチャンネルにほとんど結合親和性を示さなかった。また、アセチルコリンエステラーゼ（AChE）に対する阻害作用を検討し、既存薬（AChE 阻害剤）と共通の作用点を持たないことが明らかになった。さらに、認知機能障害改善において障害となる可能性のある ACh 合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）阻害作用についても検討し、AC-3933 に阻害作用がないことが明らかとなった（Table 2）。

Table 2 AC-3933 の各種受容体、トランスポーター、チャンネルおよび酵素に対する作用

Receptors, transporters, channels or enzymes	Species (source)	Inhibition ratio (%)
Adenosine (A ₁)	Human (cloned)	21.53
Adenosine (A _{2a})	Human (cloned)	17.44
Adenosine (A _{2b})	Human (cloned)	7.00
Adenosine (A ₃)	Rat (cloned)	0.00
Adenosine transporter	Guinea pig (brain)	3.30
α _{1A} -Adrenergic	Rat (mandibular gland)	24.18
α _{1B} -Adrenergic	Rat (liver)	0.78
α _{2A} -Adrenergic	Human (cloned)	7.27
α _{2B} -Adrenergic	Human (cloned)	3.98
α _{2C} -Adrenergic	Human (cloned)	9.87
β ₁ -Adrenergic	Human (cloned)	0.00
β ₂ -Adrenergic	Human (cloned)	0.00
β ₃ -Adrenergic	Human (cloned)	3.11
Benzodiazepine (Central)	Rat (cerebral cortex)	95.78
Benzodiazepine (Peripheral)	Rat (heart)	0.07
Bradykinin ₂	Human (cloned)	2.17
Bombesin	Human (cloned)	3.82
Calcitonin	Rat (brain)	18.35
Ca channel (L,Benzothiazepine)	Rat (cerebral cortex)	18.50
Ca channel (L,Dihydropyridine)	Rat (cerebral cortex)	2.75
Ca channel (L,Phenylalkylamine)	Rat (cerebral cortex)	6.53
Ca channel (N)	Rat (cerebral cortex)	28.12
CCK _A	Human (cloned)	1.75
Dopamine ₁	Human (cloned)	0.00
Dopamine ₂ short	Human (cloned)	0.00
Dopamine ₂ long	Human (cloned)	0.89
Dopamine ₃	Human (cloned)	0.00
Dopamine _{4,2}	Human (cloned)	0.00
Dopamine _{4,4}	Human (cloned)	0.69
Dopamine _{4,7}	Human (cloned)	0.00
Dopamine ₅	Human (cloned)	1.57
Dopamine transporter	Human (cloned)	0.00
Estrogen	Bovine (uterus)	19.12
Endothelin _A	Human (cloned)	3.23
Endothelin _B	Human (cloned)	20.17
GABA _A	Rat (cerebellum)	11.43
GABA _A (Chloride channel)	Rat (cerebral cortex)	0.00
GABA _B	Rat (cerebral cortex)	0.00
GABA transporter	Rat (cerebral cortex)	12.55
Galanin ₁	Human (cloned)	0.33

Receptors, transporters, channels or enzymes	Species (source)	Inhibition ratio (%)
Galanin ₂	Human (cloned)	0.00
Glucocorticoid	Rat (liver)	0.00
Glutamate (AMPA)	Rat (cerebral cortex)	0.00
Glutamate (Kainate)	Rat (brain)	16.75
Glutamate (NMDA agonist site)	Rat (cerebral cortex)	3.75
NMDA (Glycine site)	Rat (cerebral cortex)	8.56
NMDA (NMDA Phencyclidine site)	Rat (cerebral cortex)	0.00
NMDA (NMDA Polyamine site)	Rat (cerebral cortex)	0.00
Glycine (Strychnine sensitive)	Rat (spinal cord)	0.00
Histamine ₁ (Central)	Guinea pig (cerebellum)	0.00
Histamine ₁ (Peripheral)	Guinea pig (lung)	0.00
Histamine ₂	Rat (cerebral cortex)	13.07
Histamine ₃	Rat (brain)	6.67
IP ₃	Rat (cerebellum)	2.69
Insulin	Rat (liver)	0.00
Interleukin ₁	Human (recombinant)	0.00
K channel (KA)	Rat (cerebral cortex)	0.00
Monoamine transporter	Rabbit (platelet)	0.00
Muscarinic ₁	Human (cloned)	1.18
Muscarinic ₂	Human (cloned)	0.00
Muscarinic ₃	Human (cloned)	0.00
Muscarinic ₄	Human (cloned)	0.64
Muscarinic ₅	Human (cloned)	1.85
Na channel	Rat (brain)	0.28
Neurokinin ₁	Human (cloned)	4.82
Neurokinin ₂	Human (cloned)	1.63
Neuropeptide Y ₁	Human (cloned)	0.00
Neuropeptide Y ₂	Human (cloned)	2.89
Neurotensin	Human (cloned)	0.00
NE transporter	Human (cloned)	3.31
Nicotine	Human (cloned)	0.00
Opiate (δ)	Human (cloned)	1.67
Opiate (κ)	Human (cloned)	0.00
Opiate (μ)	Human (cloned)	5.69
Progesterone	Bovine (uterus)	0.00
Serotonin ₁	Rat (striatum)	6.37
Serotonin _{1A}	Human (cloned)	4.80
Serotonin _{1B}	Human (cloned)	2.25
Serotonin _{1D}	Human (cloned)	0.27
Serotonin _{2A}	Human (cloned)	7.19
Serotonin _{2B}	Human (cloned)	0.52
Serotonin _{2C}	Human (cloned)	0.24
Serotonin ₃	Human (cloned)	16.42
Serotonin ₄	Guinea pig (striatum)	0.00
Serotonin _{5a}	Human (cloned)	4.50
Serotonin ₆	Human (cloned)	0.00
Serotonin ₇	Human (cloned)	0.40
Sigma ₁	Guinea pig (brain)	0.11
Sigma ₂	Rat (brain)	0.00
Testosterone	Rat (prostate gland)	0.00
Vasopressin _{1b}	Human (cloned)	0.00
AChE	Electric eel	0.00
ChAT	Human (placenta)	0.00

2-3 [³⁵S]TBPS 結合試験

GABA (1 μM) 存在下で AC-3933 は濃度依存的に [³⁵S]TBPS 結合を増加させたが、その増加は緩やかであり、100-3,000 nM においてはその増加はほぼ一定であった (115.2 ± 0.4% から 117.4 ± 1.2%) (Fig. 4A)。一方、BZR フルインバースアゴニストの β-CCM は、300 nM において最大増加作用 (130.4 ± 0.8%) を示した後、10,000 nM まで用量依存的にその作用は減弱した (105.2 ± 0.9%) (Fig. 4B)。BZR アンタゴニストの flumazenil は、10-1,000 nM において僅かに [³⁵S]TBPS 結合を減少させ (95.5 ± 1.2% から 93.3 ± 1.6%)、BZR アゴニストの diazepam は濃度依存的に [³⁵S]TBPS 結合を減少させた (10,000 nM にて 46.2 ± 2.0%) (Fig. 4C)。

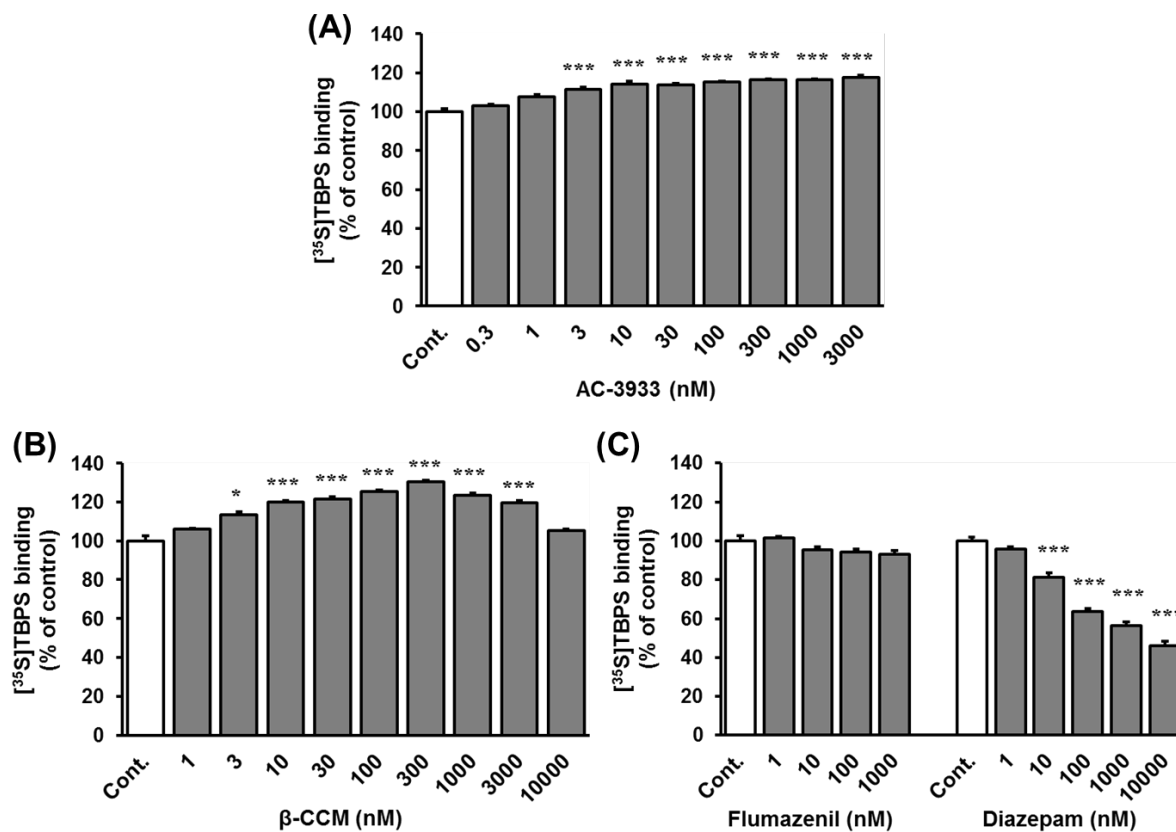


Fig. 4. Effects of AC-3933 and other BZR ligands on [³⁵S]TBPS binding to rat cortical membrane. The effects of test-compounds (A; AC-3933, B; β-CCM, C; flumazenil and diazepam) were expressed as percentage of [³⁵S]TBPS binding. The reaction was performed with [³⁵S]TBPS (2 nM) in the presence of GABA (1 μM) at 25°C for 90 min. Data represent the mean ± SEM from three independent experiments. **p*<0.05, ****p*<0.001 significantly different from the control (Dunnnett's multiple comparison test).

2-4 ラット海馬切片における高 K⁺誘発アセチルコリン遊離増強作用

溶媒処置群における S2/S1 比は、 0.94 ± 0.04 (S1; 808 ± 72.4 fmol/mL、S2; 755 ± 65.3 fmol/mL) であった (Fig. 5)。AC-3933 は 0.1-10 μ M の用量において用量依存的に高 K⁺誘発 ACh 遊離を増強し、1 μ M と 10 μ M の濃度において有意な遊離増強作用が認められた(それぞれ 20.8%および 32.9%増加) (Fig. 5)。

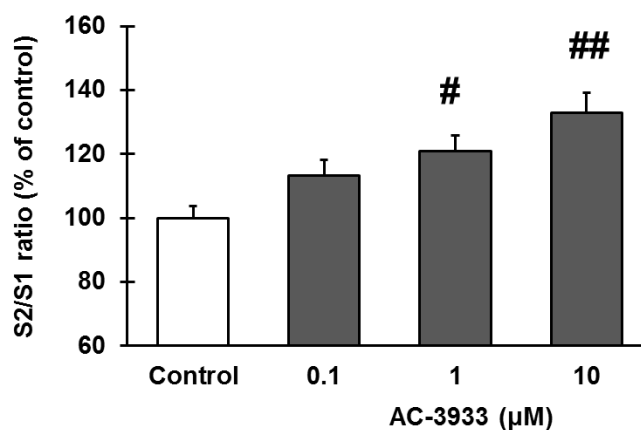


Fig. 5. Effects of AC-3933 on K⁺-evoked ACh release from rat hippocampal slices. Tissue slices were depolarized with 25 mM KCl. The perfusates were collected for 20 min as pre-stimulation phase (S1; in the absence of AC-3933) and as post-stimulation phase (S2; in the presence of AC-3933 at each concentration). Results are expressed as % of S2/S1 ratio in the control group (mean \pm SEM) from three independent experiments. n = 9 slices per group. # p <0.05, ## p <0.01, significantly different from the control group (Dunnett's multiple comparison test).

2-5 ラット海馬スライス集合電位の長期増強 (LTP) 増大作用

溶媒処置による LTP の増強は $108.7 \pm 1.3\%$ であった。AC-3933 処置による LTP の増強は、0.1 から $10 \mu\text{M}$ において濃度依存性に LTP を増大し、1 および $10 \mu\text{M}$ で有意な増大作用を示した (Fig. 6)。また、AC-3933 は濃度依存的に PS の振幅自体も増加させ、テタヌス刺激直前 10 分間の集合電位の平均相対振幅は $1 \mu\text{M}$ および $10 \mu\text{M}$ の AC-3933 処置において有意に増加した (それぞれ $113.7 \pm 1.6\%$ および $118.8 \pm 2.4\%$) (グラフ非開示)。

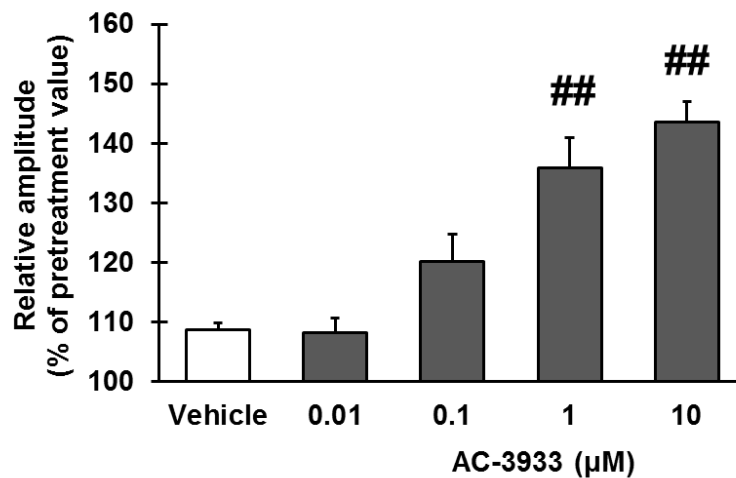


Fig. 6. Effects of AC-3933 on the LTP of population spike in the CA1 region of rat hippocampal slice. AC-3933 was applied from 20 min before until 10 min after tetanic stimulation. Each column represents the mean \pm SEM ($n = 8$) of relative amplitude between 10 and 30 min following tetanic stimulation. $##p < 0.01$, significantly different from the control (Dunnett's multiple comparison test).

3. 考察

我々が探索研究の過程で見出した 1, 6-ナフチリジン骨格を有する AC-3933 は、BZR 結合試験の結果から BZR リガンドとして広く知られている β -CCM や flumazenil とほぼ同等の BZR への親和性を有することが明らかとなった。また、オフターゲットの検討結果から、AC-3933 は選択的な BZR リガンドであることが示された。既存薬 (AChE 阻害剤) と併用する場合を想定して、AC-3933 の AChE 阻害作用について評価したが、全く阻害活性を持たなかった。AChE 阻害剤の併用は消化器系副作用の懸念があり難しい⁸⁰⁾ことから、この結果は、AC-3933 が臨床において併用使用できる可能性を示している。BZR は、5 つのサブユニットから構成されるクロライドイオン透過性の GABA_A 受容体の一部に結合サイトが存在しており、BZR リガンドの BZR への結合は、GABA の影響を強く受けることが知られている^{37, 38)}。この性質を利用して、BZR リガンドの固有活性は GABA 非存在下に対する GABA 存在下での BZR 結合親和性の比 (GABA 比) で評価でき、GABA 比の値によりアゴニスト (GABA 比; >1)、アンタゴニスト (GABA 比; \approx 1)、およびインバースアゴニスト (GABA 比; <1) の 3 種に区分される^{25, 39)}。我々の評価結果から、AC-3933 の GABA 比は 1 より小さいことが明らかになった。このことは、AC-3933 はインバースアゴニストとしての性質を有することを示している。また、AC-3933 の GABA 比 (0.84) は、BZR フルインバースアゴニストとして知られている β -CCM の GABA 比よりも大きいことからインバースアゴニストとしての固有活性は β -CCM よりも弱いことが明らかになった。

さらに AC-3933 の BZR インバースアゴニストとしての性質を明らかにするために、^[35S]TBPS 結合試験を行った。^[35S]TBPS は、GABA_A 受容体/クロライドチャンネル複合体のクロライドイオン透過孔近傍にあるとされる picrotoxin 結合部位へ特異的に結合する RI 標識リガンドである。その結合は、アロステリックに BZR リガンドの影響を受けることが知られており、BZR リガンドの作用特性評価に汎用されている^{33, 40)}。例えば、GABA 存在下で BZR アゴニストが GABA_A 受容体へ結合し、クロライドチャンネルの流入がより強くなるような立体構造の変化が起きると、TBPS 結合量は減少する。逆に、GABA 存在下で BZR インバースアゴニストが作用するとその結合量は増加する^{41, 42, 43)}。今回の検討では、BZR アゴニスト diazepam は GABA 存在下で^[35S]TBPS 結合量を有意に減少させ、AC-3933 は β -CCM と同様、GABA 存在下で^[35S]TBPS 結合量を有意に増加させた。この結果は、AC-3933 が BZR に対しインバースアゴニスト活性を有していることを示唆している。しかしながら、AC-3933 の作用は 100 nM から 3000 nM の濃度においてほとんど TBPS 結合量を増加させず、また最大増加量は β -CCM の増加量に比べて小さかった。GABA 比

の結果と^[35]SJTBPS 結合試験の結果から、AC-3933 のインバースアゴニストとしての固有活性はパーシャル性を有していると推察される。

学習記憶に重要な働きをされると考えられている ACh 神経系の活動性は GABA によって抑制的に制御されている^{27, 44, 45, 99)}。実際、GABA_A 受容体アゴニストの muscimol あるいは GABA_A 受容体拮抗薬の bicuculline は、それぞれ海馬における ACh の遊離量を減少もしくは増加させる^{44, 45)}。加えて、GABA_A 受容体の機能をアロステリックに調節する BZR リガンドも ACh 神経系の活動性を変化させることが報告されている²⁸⁾。本研究において、AC-3933 は濃度依存的かつ有意に海馬スライス切片における高 K⁺ 誘発 ACh 遊離を増強した。この結果は、AC-3933 が神経の活動性亢進時において ACh 遊離を増強することを示唆している。アルツハイマー病患者の認知機能障害と ACh 神経機能低下には密接な関係があることが明らかになっており^{9, 10)}、現在、臨床において認知症治療薬として広く使用されているアセチルコリンエステラーゼ阻害剤は、ACh の分解阻害作用により脳内 ACh 量を増やして ACh 神経系の機能低下を改善する¹³⁾。AC-3933 においてアセチルコリンエステラーゼ阻害作用は認められなかったが、ACh 遊離増強作用が認められたことから AC-3933 が認知症治療薬となる可能性が期待できる。

シナプスレベルでの記憶形成のモデルとして長期増強 (LTP) 現象が知られている⁴⁶⁾。海馬では、CA1 領域における錐体細胞の興奮性が GABA 介在神経によって抑制的に制御されており、LTP の誘導に抑制を掛けている^{47, 48)}。実際に、GABA による集合電位 (PS) の振幅の抑制作用や、BZR インバースアゴニストによる LTP 現象の増強作用がこれまでに数多く報告されている^{36, 49, 50)}。我々は、海馬 CA1 領域における LTP に対する AC-3933 の影響について検討を行い、AC-3933 が濃度依存的かつ有意に LTP を増強することを明らかにした。加えて、テタヌス刺激前の PS の振幅自体を AC-3933 は増強させることも明らかとなった。これらの結果は、AC-3933 が海馬 CA1 領域において GABA 神経系によって抑制的制御を受けている神経系の神経伝達機能を亢進させるとともに、高頻度刺激によって誘導されるシナプス可塑性をも高めることを示しており、生体において記憶形成を促進し、認知機能を増強する可能性を示唆するものである。

第2章 AC-3933 の認知機能障害改善薬としての特性

ヒトや動物における様々な研究によって、脳内アセチルコリン (ACh) 神経系は認知機能に重要な役割を果たしていることが実証されてきた⁵¹⁾。事実、アルツハイマー病患者や加齢に伴う認知機能障害を有する患者の脳においては、ACh 神経系の脱落や機能不全が報告されている^{9, 10, 52)}。現在臨床において広く用いられているアルツハイマー病治療薬の多くは ACh の分解を阻害する薬剤 (アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害剤) であり、このことは、認知機能の低下と ACh 神経系の機能低下が密接に関わっていることを示している^{11, 12, 13, 14, 53, 54)}。

神経細胞への過剰なグルタミン酸 (Glu) の暴露あるいは Glu による NMDA 受容体への過剰な刺激は、神経細胞死を誘発することが知られている。このため、中等度・重度アルツハイマー型認知症の治療に用いられている NMDA 受容体拮抗薬の memantine は、Glu 神経毒性からの神経保護効果が期待されている^{15, 55, 56)}。一方で、脳内 Glu 神経系は、電気生理学的検討および行動薬理学的検討から認知機能に重要な役割を果たしていることが明らかにされている^{57, 58, 59, 60)}。加えて、死後脳の研究において、アルツハイマー病患者における海馬と嗅内皮質の NMDA 受容体の減少と神経病理学的な進行レベルにおいて良い相関があるという報告もあり^{61, 62)}、過剰な NMDA 受容体の活性化を伴わない Glu 神経系の賦活化剤は、従来の治療薬とは異なる作用機序を有する新しい認知症治療薬となる可能性が考えられる。

第2章では、AC-3933 の認知機能障害改善薬としての特性について *in vivo* 試験によって評価した結果を報告する。認知症治療薬の donepezil は脳波を変化させることから⁹⁸⁾、まず AC-3933 の脳波に対する影響について評価し、donepezil による脳波変化との比較を行った。また、認知機能に関係する ACh の遊離に対する影響を生体レベルで確認するため、*in vivo* マイクロダイアリス法を用いて AC-3933 投与後の海馬 ACh 遊離増強作用について検討した。さらに、AC-3933 の認知症治療薬の可能性を探るため、行動薬理学的手法を用いて ACh 神経系の機能低下に伴う認知機能障害 (scopolamine 誘発記憶障害) の改善作用、Glu 神経系の機能低下に伴う認知機能障害 (MK-801 誘発記憶障害) の改善作用、および加齢に伴う記憶力低下の改善作用について検討した。加えて、臨床において既存薬と併用する場合を想定し、donepezil との併用投与による認知機能障害改善効果についても検討した。

1. 実験材料と実験方法

本章における動物を用いた試験は、すべて大日本住友製薬株式会社 研究本部動物実験委員会による承認を受け、実験動物取扱ガイドラインに従って実施した。

1-1 使用動物

雄性 Wistar ラット (260-360 g) および雄性 ddY マウス (25-30 g) を日本エスエルシーから、C57BL/6N マウス (19 か月齢) を日本チャールス・リバーから入手した。紙性床敷きを敷き詰めたプラスチック製のケージに、ラットを 2-3 匹ずつ、あるいはマウスを 7-8 匹ずつ収容した。また、老齢マウスは闘争による受傷を防ぐため個別飼育を行った。照明 (午前 7 時から午後 7 時まで点灯)、室温 ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$)、湿度 ($55 \pm 15\%$) が自動管理された動物室にて動物は飼育され、エサ (CE-2, 日本クレア) および水は自由に摂取できるように与えられた。入荷後、7 日以上の馴化期間をおき、その後実験に用いた。

1-2 使用薬物

AC-3933 および donepezil hydrochloride (donepezil) は大日本住友製薬 (株) 化学研究所にて合成した。その他、試験に用いた以下の化合物については Sigma-Aldrich より入手した: β -carboline-3-carboxylic acid methyl amide (FG-7142)、(-)-scopolamine hydrobromide (scopolamine) および(+)-MK-801 hydrogen maleate (MK-801)。

AC-3933、FG-7142 および donepezil は、0.5% トラガント溶液に懸濁した。AC-3933 と donepezil の併用効果に関する評価では、AC-3933 と donepezil の混合液を調製した。Scopolamine および MK-801 は、生理的食塩液に溶解した。ラットおよびマウスにおける投与容量は、それぞれ 2 mL/kg および 10 mL/kg とした。

1-3 無拘束ラットにおける脳波賦活作用

ペントバルビタール (50 mg/kg, ip) 麻酔下、Paxinos と Watson⁶³⁾の脳アトラスに従い、前頭皮質 (ブレグマより前方 3.5 mm、正中より側方 3.0 mm) および同側後頭皮質 (ブレグマより後方 8.0 mm、正中より側方 4.0 mm) にドリルで穴をあけ、硬膜表面にスクリー電極を留置した。また、不関電極 (ネジ電極) は小脳上の頭蓋 (正中線上) に留置した。これらの電極に小型の 9 ピンコネクター (MK-202、インターメディカル) を接続し、頭蓋に固定した。電極留置術より 2 週間の回復期をおいた後、脳波測定試験を行った。

シールドを施した防音箱内の透明アクリル製の箱 (30×30×29 cm) に動物を入れ、アクリル箱の天井に取り付けてあるマーキュリースリップリング (Air-flyte) のコネク

ターと動物の電極に接続した。また、スリップリングは防音箱外にある生体アンプ（1253A、日本電気三栄）へ接続し、analog/digital (A/D) 変換ボード（ADM-1698BPC、マイクロサイエンス）を介してコンピューターへ接続した。アンプのパラメーターは時定数 0.1 秒、ハイカット周波数を 100 Hz に設定した。脳波測定は、連続 2 日間で実施した。動物を記録チャンバーに入れ、1 時間後に溶媒（1 日目）または被験物質（2 日目）を経口投与し、各日 4.5 時間脳波を連続記録した。

脳波の解析には、2つのソフトウェアを用いた（ヒューマンインターフェイスに Turbo Pascal、計測処理には Borland C⁺⁺、一部高速処理においては Turbo Assembler を使用）。脳波のアナログ電圧をサンプリング周波数 128Hz で A/D 変換を行い、コンピューターに取り込んだ。脳波信号はコンピューターで連続的に収集し、遮断周波数 40Hz の高周波遮断デジタルフィルターを作用させ、高速フーリエ変換を行い、周波数解析結果として記録した。周波数は 7 帯域（1-4 Hz、4-6 Hz、6-8 Hz、8-10 Hz、10-12 Hz、12-20 Hz、20-40 Hz）に区分し、投与直後から記録終了まで 30 分間毎に各周波数帯域の相対パワー（全体に対する %）を計算した。被験物質投与時と溶媒投与時間の相対パワーの差を評価した。

1-4 無拘束ラット海馬におけるアセチルコリン遊離促進作用

雄性 Wistar ラット（260-360 g）を使用した。ペントバルビタール（50 mg/kg, ip）麻酔下、Paxinos と Watson⁶³⁾の脳アトラスに従い、海馬（ブレグマより後方 5.8 mm、正中より側方 5.0 mm、硬膜より深さ 2.5 mm）にガイドカニューレを挿入し、歯科用セメントを用いて頭蓋に固定した。胃内投与のためのポリエチレンカテーテルを 10 mm 胃へ挿入し固定、さらに皮下を通して後頸部へ 20 mm 露出させ、ポリエチレン製のキャップで蓋をした。

ガイドカニューレ留置術の 3 から 8 日後にマイクロダイアリス試験を行った。ガイドカニューレを通してマイクロダイアリス用プローブ（A-I-8-05、Eicom）を挿入し、Ringer 液（(in mM) NaCl (147)、KCl (4)、CaCl₂ (2.3)）を流速 1 μ L/min で灌流させた。透析液は、20 分毎に採取し、HPLC 装置で透析液中の ACh 量を測定した（HPLC 装置詳細は第 1 章 1-6 に記載）。それぞれの透析液中には、内部標準物質として isopropylhemicholine (0.2 pmol) を添加した。灌流開始より 1 時間以上経過後、3 フラクション分（20 分 \times 3）を基礎遊離量として採取し、その後 AC-3933 もしくは溶媒を胃内投与した。灌流液は投与後 3 時間まで収集した。

1-5 Y字型迷路試験

Y字型迷路試験は、Yamada ら^{64,65)}の方法に従って行った。試験開始 90 分前に被験物質の経口投与を行い、記憶障害を惹起させるために scopolamine (ムスカリン様 ACh 受容体拮抗薬 ; 0.6 mg/kg) もしくは MK-801 (NMDA 受容体拮抗薬 ; 0.1 mg/kg) を試験開始 30 分前に皮下投与した。試験では Wistar ラットあるいは ddY マウスをそれぞれ専用の Y 字型迷路 (ラット用 : アームの長さ, 35 cm; 高さ, 25 cm; 幅, 10 cm、マウス用 : アームの長さ, 40 cm; 高さ, 12 cm; 下辺, 3 cm; 上辺, 10 cm、いずれも黒色プラスチック製 ; Fig. 7) の 1 つのアームの端に入れ、8 分間自由に迷路内を探索させた。後肢がアーム内へ完全に侵入した時にアームへの侵入とし、記録用紙にアーム番号を記録した。連続して異なるアームへ侵入した回数 (交替行動回数) を数え、以下の式により自発的交替行動率を計算した。

$$\text{自発的交替行動率} = \{ \text{交替行動回数} / (\text{全アーム侵入回数} - 2) \}$$

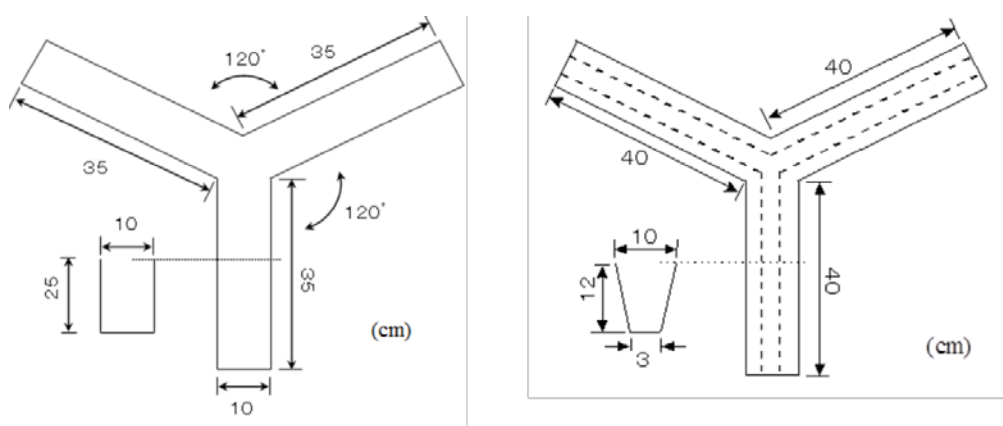


Fig. 7. ラット用 Y 字型迷路 (左) とマウス用 Y 字型迷路 (右)

1-6 物体位置記憶試験

試験開始 60 分前に被験物質の経口投与を行い、記憶障害を誘発させるために MK-801 (NMDA 受容体拮抗薬 ; 0.05 mg/kg) を試験開始 30 分前に皮下投与した。物体位置記憶試験は、第 1 試行と第 2 試行から構成される。2 つの試行の間に 60 分の試験間インターバルを設定した。第 1 試行では、同形の 2 つの物体 (円錐台 : 上面直径, 4.5 cm; 下面直径, 6.0 cm; 高さ, 3.5 cm) を一つは箱の中央に、一つはコーナーに置いた試験箱 (22.5 × 24.5 × 11.0 cm、茶色のプラスチック製、茶色半透明の蓋あり) の中に ddY マウスを入れ、5 分間自由に探索させた。第 2 試行では、中央の物体 (displaced object: DO) をコーナーに置いてあった物体 (non-displaced object: NDO) の逆コーナーへ移動させ、再びマウスを試験箱へ入れて自由に探索させた。DO と NDO への探索時間をストップウォッチで計測し、

記録用紙に記録した (Fig. 8)。物体への探索行動は、物体のにおいを嗅ぐあるいは鼻で物体に触る行動と定義した。DO と NDO の探索時間を以下の式に当てはめ識別係数 (DI) を算出した。

$$DI = \{ (\text{DO の探索時間} - \text{NDO の探索時間}) / (\text{DO の探索時間} + \text{NDO の探索時間}) \}$$

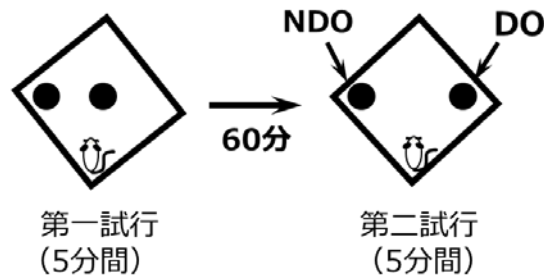


Fig. 8. 物体位置記憶試験

1-7 老齢マウスにおける認知機能増強作用

1-7-1 Y字型迷路試験

認知機能が低下しているマウスを選別するため、薬効評価試験の前に被験物質処置なしの条件で第2章 1-5に記載した方法に従いY字型迷路試験を行った(予備試験)。予備試験に用いたマウス46匹より、自発的交替行動率の低い順にマウス24匹を選別し、薬効評価試験に用いた。各マウスの自発的交替行動率と全アーム侵入回数データを用いて、多変数によるブロック化割り付け(SAS[®] system, SAS Institute Japan Ltd., Japan)を用いて群分けを行った。Y字型迷路試験は、第2章 1-5に記載した方法に準じて実施した。薬効評価試験では、AC-3933は試験開始60分前に経口投与した。

1-7-2 物体認識試験

物体認識試験は、第1試行と第2試行から構成される。2つの試行の間に3時間の試験間インターバルを設定した。第1試行では、同形の2つの物体(円錐台:上面直径, 4.5 cm; 下面直径, 6.0 cm; 高さ, 3.5 cm)を箱のコーナーに置いた試験箱(22.5×24.5×11.0 cm、茶色のプラスチック製、茶色半透明の蓋あり)の中にC57BL/6Nマウスを入れ、5分間自由に探索させた。第2試行では、第1試行で探索時間の短かった物体の代わりに新奇物体(ダイバーリング:外径, 7.5 cm; 内径, 2.5 cm; 高さ, 2.0 cm)に置き換え、再びマウスを自由に5分間探索させた。既知物体(familiar object; F)と新奇物体(novel object; N)に対する探索時間を計測し、記録した(Fig. 9)。物体への探索行動は、物体のにおいを嗅ぐあ

るいは鼻で物体に触る行動と定義した。F と N への探索時間を以下の式に当てはめ識別係数 (DI) を算出した。

$$DI = \{ (F \text{ の探索時間} - N \text{ の探索時間}) / (F \text{ の探索時間} + N \text{ の探索時間}) \}$$

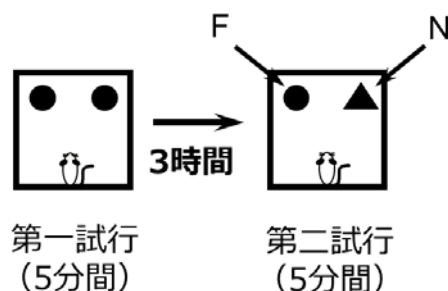


Fig. 9. 物体認識試験

認知機能が低下しているマウスを選別するため、本試験の前に被験物質処置なしの条件で物体認識試験を行った (予備試験)。予備試験に用いた 43 匹中、DI 値の低い順にマウス 24 匹を選別し薬効評価試験に用いた。各マウスの DI 値を用いて、多変数によるブロック化割り付け (SAS[®] system, SAS Institute Japan Ltd., Japan) を用いて群分けを行った。薬効評価試験では、AC-3933 は試験開始 60 分前に経口投与した。

1-8 統計解析

データは平均値と標準誤差 (SEM) で表記した。また、すべての統計解析は SAS[®] System を用いて実施した。

脳波に対する影響についての解析は、Tang ら⁶⁶⁾の方法に準じて行った。投与直後から 270 分後まで各時点における 7 周波数帯のパーセント振幅の、個体毎の溶媒投与時と被験物質投与時との間の差を算出し、paired t-test を用いて解析した。

ACh 遊離試験における ACh 濃度-時間曲線下面積 (AUC) の解析については、溶媒投与群と AC-3933 の各処置濃度群との間で Dunnett 型多重比較試験を用いた。

Y-maze test では、交替行動率または全アーム侵入回数について溶媒処置群と記憶障害群との比較を Wilcoxon rank sum test、記憶障害群と被験物質の各用量投与群との間 (ただし、老齢マウスの Y-maze test は溶媒処置群と AC-3933 処置群間) で non-parametric Dunnett 型多重比較試験を用いて解析した。

物体位置記憶試験では、第 1 試行において異なる位置に置いた物体に対する嗜好性を評価するために、各処置群のそれぞれの物体に対する探索時間について反復測定二元配置分

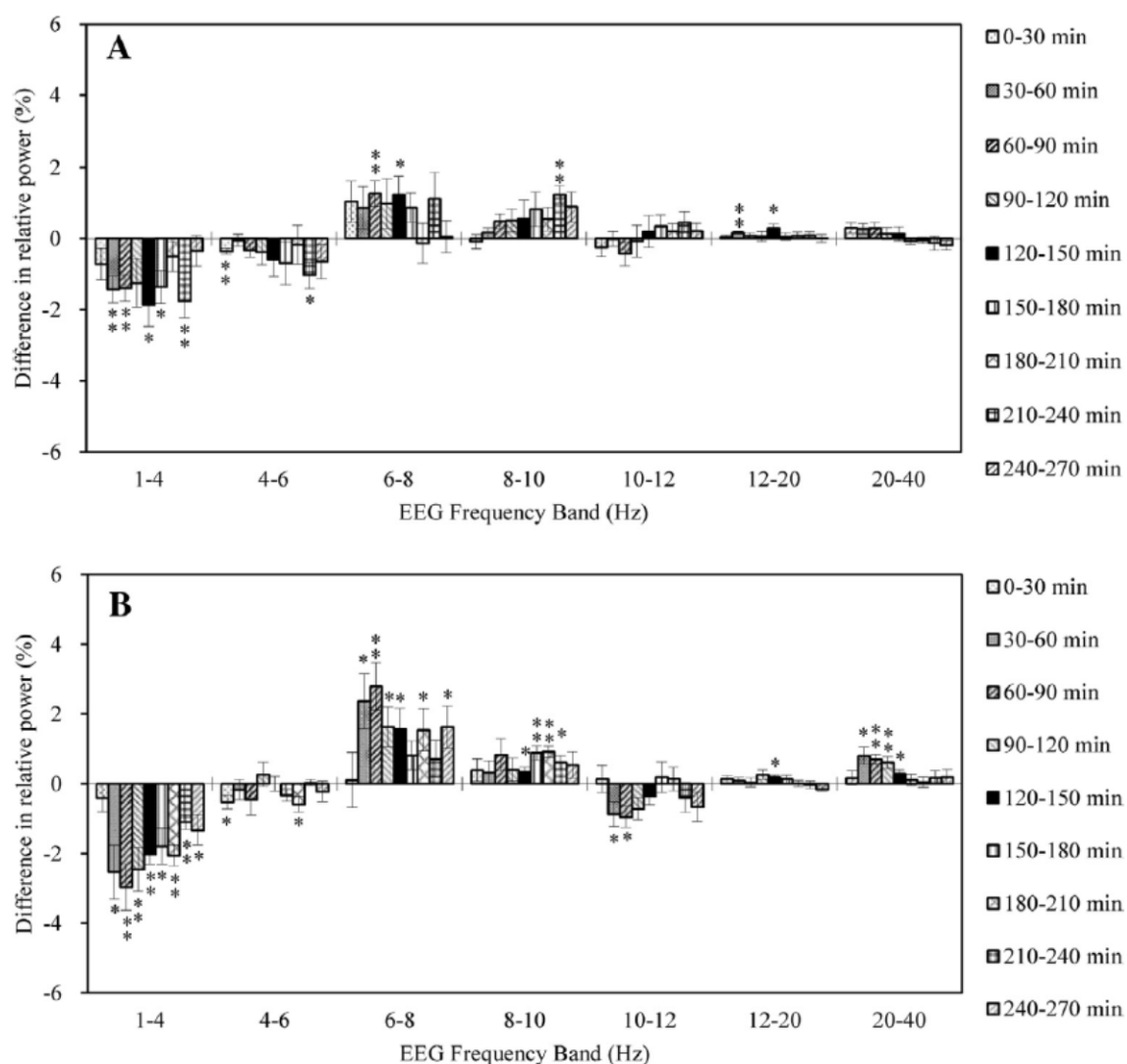
散分析にて検定した。また、第 1 試行において被験物質の投与が動物の探索行動に影響しているか否かについて評価するために、各処置群の 2 物体に対する全探索時間について一元配置分散分析を行った。さらに、第 2 試行における DO と NDO に対する探索時間について反復測定二元配置分散分析にて検定し、有意差がみとめられた場合、paired t-test を用いて解析した。物体位置試験の識別係数については、一元配置分散分析を行った後 Tukey 型多重比較試験にて解析した。

物体認識試験では、第 1 試行において 2 つの物体に対する嗜好性を評価するために、各処置群のそれぞれの物体に対する探索時間について反復測定二元配置分散分析にて検定した。また、第 1 試行において被験物質の投与が動物の探索行動に影響しているか否かについて評価するために、各処置群の 2 物体に対する全探索時間について一元配置分散分析を行った。さらに、第 2 試行における既知物体と新奇物体に対する探索時間について反復測定二元配置分散分析を行った。物体認識試験の識別係数については、一元配置分散分析を行った後溶媒処理群と AC-3933 処置群との間で Dunnett 型多重比較試験を用いて解析した。有意水準はすべて両側 5%とした。

2. 実験結果

2-1 無拘束ラットにおける脳波賦活作用

AC-3933 は、6-8 Hz および 20-40 Hz の相対パワーの増加ならびに 1-4 Hz の相対パワーの減少が顕著であり、これらを用量依存的に変化させた (Fig. 10)。アセチルコリンエステラーゼ阻害薬 donepezil も同様に 6-8 Hz および 20-40 Hz の相対パワーを増加し、1-4 Hz の相対パワーを減少させたが、加えて 4-6 Hz のパワーを増加し、8-10 Hz のパワーを減少させた (Fig. 11)。



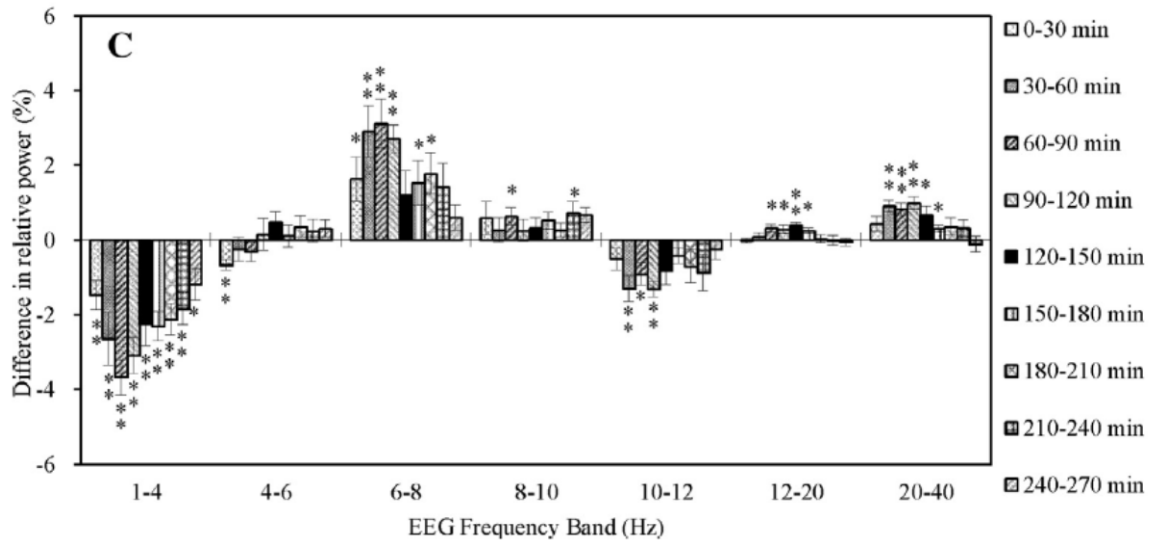


Fig. 10. Effects of AC-3933 on EEG relative power in rats. AC-3933 was orally given to rats at 3 (A), 10 (B), and 30 (C) mg/kg. Relative power (%) for every 30-min interval after AC-3933 administration was recorded. Each column represents the mean \pm SEM of the difference in relative power between the drug session and the vehicle session. * p <0.05, ** p <0.01 vs. vehicle-treated group (two-sided paired t-test). $n = 8$ for each treatment group.

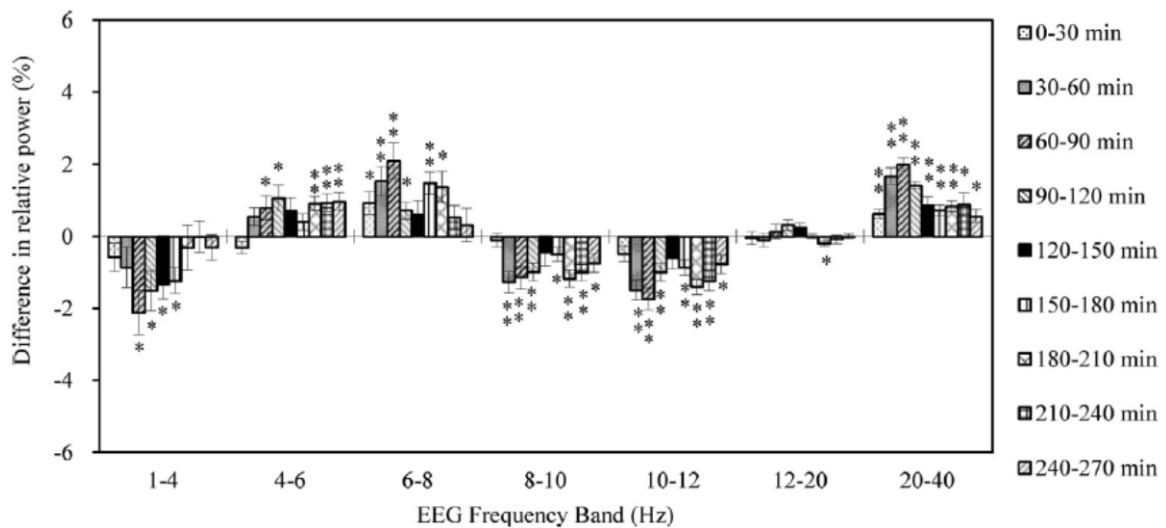


Fig. 11. Effects of donepezil on EEG relative power in rats. Donepezil was orally given to rats at 10 mg/kg. Relative power (%) for every 30-min interval after donepezil administration was recorded. Each column represents the mean \pm SEM of the difference in relative power between the drug session and the vehicle session. * p <0.05, ** p <0.01 vs. vehicle-treated group (two-sided paired t-test). $n = 8$ for each treatment group.

2-2 無拘束ラット海馬におけるアセチルコリン遊離促進作用

アセチルコリンエステラーゼ阻害剤 physostigmine 非存在下で試験を実施した。無拘束覚醒ラット海馬からの ACh 基礎遊離量は、 46.4 ± 1.77 fmol/フラクション (20 分間) であった (Fig. 12A)。AC-3933 は、胃内投与により、3 および 10 mg/kg の用量において、ラット海馬からの ACh 遊離量を増加させた (基礎遊離量から最大 $134 \pm 15.4\%$ および $175 \pm 16.7\%$) (Fig. 12A)。溶媒投与後 2 時間までの ACh 総遊離増加量 (AUC_{0-2h}) は、 $187.7 \pm 7.4\%$ ・時間であった (Fig. 12B)。AC-3933 投与後の AUC_{0-2h} は、3 および 10 mg/kg の用量それぞれ $230.6 \pm 11.9\%$ ・時間および $288.3 \pm 31.2\%$ ・時間であり、10 mg/kg 投与においては、溶媒投与に比べ有意な遊離増加作用が認められた (Fig. 12B)。

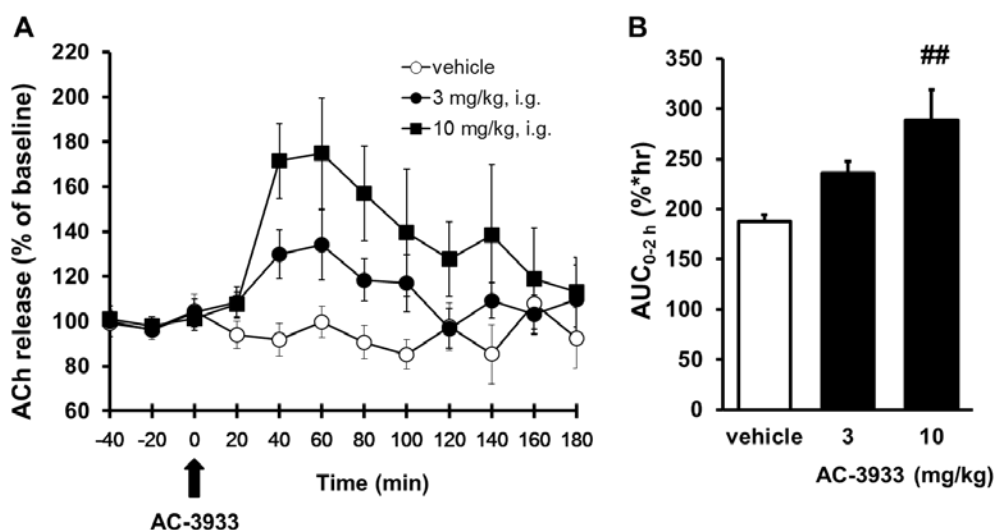


Fig. 12. Effects of AC-3933 on extracellular ACh level in the hippocampus of freely moving rats. (A) The results are expressed as percentage change (mean \pm SEM) from the mean of three collection periods (basal value) before AC-3933 administration, shown by the arrow. Animals were intragastrically given AC-3933 at 3 (closed circles) or 10 (closed squares) mg/kg, or the vehicle (open circles). $n = 8$ per group. (B) Each column represents the mean \pm SEM of AUC for each group ($n = 8$) 2 hours after administration of AC-3933 or the vehicle. $##p < 0.01$, significantly different from the vehicle-treated group (Dunnett's multiple comparison test).

2-3 スコポラミン誘発記憶障害改善作用

2-3-1 ラット Y 字型迷路試験

Scopolamine (0.6 mg/kg) は、ラットにおいて有意に自発的交替行動を有意に減少させ、短期の空間作業記憶を障害した (Fig. 13A, C)。AC-3933 は、0.01 および 0.03 mg/kg の用量で scopolamine による自発的交替行動の減少を有意に回復させた (Fig. 13A)。Donepezil は、1 および 3 mg/kg の用量で scopolamine による自発的交替行動の減少を有意に回復させた (Fig. 13C)。Scopolamine は、ラットの全アーム侵入回数を有意に増加させたが、AC-3933 および donepezil はいずれも今回用いた用量において scopolamine によるアーム侵入回数の増加に影響を与えなかった (Fig. 13B, D)。

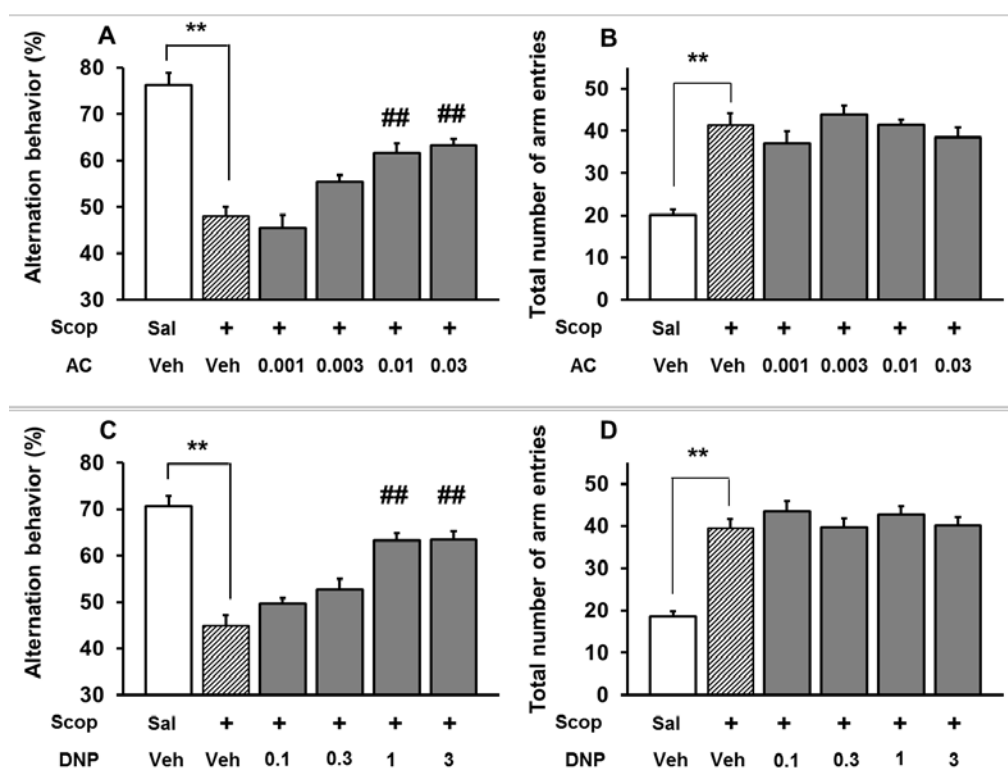
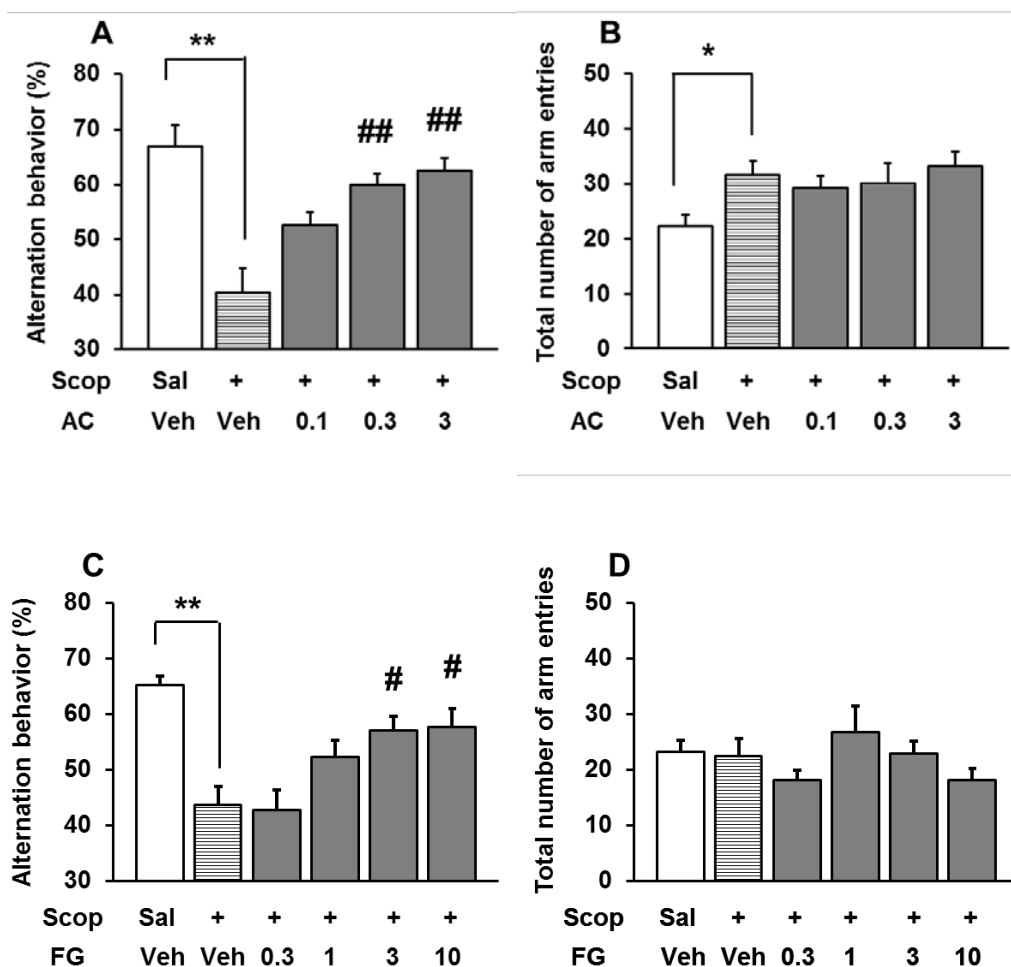


Fig. 13. Effects of AC-3933 and donepezil on scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in the Y-maze test in rats. A and C: % of alternation behavior. B and D: total number of arm entries. AC-3933 or donepezil was orally given to rats 90 min prior to the test. Scopolamine was subcutaneously injected to mice 30 min prior to the test. Scop: scopolamine (0.6 mg/kg, s.c.). AC: AC-3933 (0.001-0.03 mg/kg, p.o.). DNP: donepezil (0.1-3 mg/kg, p.o.). Sal: physiological saline. Veh: vehicle for AC-3933 and donepezil, 0.5% tragacanth gum in water. Each column represents the mean \pm SEM. $n = 10$ per group. $**p < 0.01$: vs. (Sal + Veh)-treated group (Wilcoxon rank sum test); $##p < 0.01$: vs. (Scop + Veh)-treated group (non-parametric Dunnett's multiple comparison test).

2-3-2 マウス Y 字型迷路試験

Scopolamine (0.6 mg/kg) は、マウスの自発的交替行動を有意に減少させ、空間作業記憶を障害した (Fig. 14A, C, E)。AC-3933 は、0.3 および 3 mg/kg の用量で scopolamine による自発的交替行動の減少を有意に回復させた (Fig. 14A)。BZR インバーシアゴニスト FG-7142 は、3 および 10 mg/kg の用量で、また、donepezil は 10 および 15 mg/kg の用量で scopolamine による自発的交替行動の減少を有意に回復させた (Fig. 14C, E)。AC-3933 および FG-7142 はスコポラミン処置マウスの全アーム侵入回数に対して影響を与えなかった (Fig. 14B, D) が、donepezil は 15 mg/kg の用量においてわずかではあるが、有意に侵入回数を減少させた (Fig. 14F)。



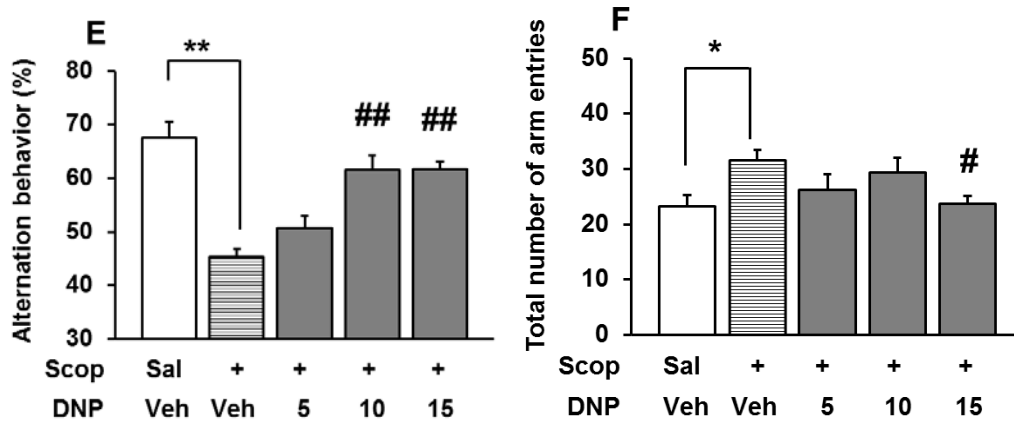


Fig. 14. Effects of AC-3933, FG-7142 and donepezil on scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in the Y-maze test in mice. A, C and E: % of alternation behavior. B, D and F: total number of arm entries. AC-3933, FG-7142 or donepezil was orally given to mice 90 min prior to the test. Scopolamine was subcutaneously injected to mice 30 min prior to the test. Scop: scopolamine (0.6 mg/kg, s.c.). AC: AC-3933 (0.1-3 mg/kg, p.o.). FG: FG-7142 (0.3-10 mg/kg, p.o.). DNP: donepezil (5-15 mg/kg, p.o.). Sal: physiological saline. Veh: vehicle for AC-3933, FG-7142 and donepezil, 0.5% tragacanth gum in water. Each column represents the mean \pm SEM. AC-3933; n=8 per group. FG-7142; n=12 per group. Donepezil; n=10 per group. * p <0.05, ** p <0.01: vs. (Sal + Veh)-treated group (Wilcoxon rank sum test); # p <0.05, ### p <0.01: vs. (Scop + Veh)-treated group (non-parametric Dunnett's multiple comparison test).

2-3-3 Donepezil との併用効果 (Y 字型迷路試験)

Scopolamine 誘発自発的交替行動障害は、0.3 および 1 mg/kg の AC-3933 の単独投与によって有意に改善された (Fig. 15)。単独処置ではほとんど改善効果を示さない用量の donepezil (3 mg/kg) と AC-3933 (0.01-1 mg/kg) を併用投与すると、AC-3933 が単独では効果を示さない 0.03 mg/kg の用量より改善傾向が認められ、0.1 mg/kg 以上の AC-3933 と 3 mg/kg の donepezil との併用では統計学的に有意な効果が認められた (Fig. 15)。いずれの処置においてもマウスの全アーム侵入回数への影響は認められなかった (data not shown)。

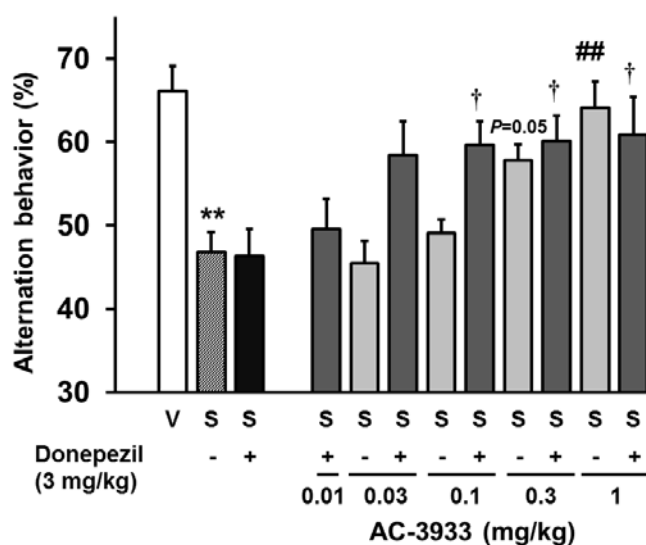
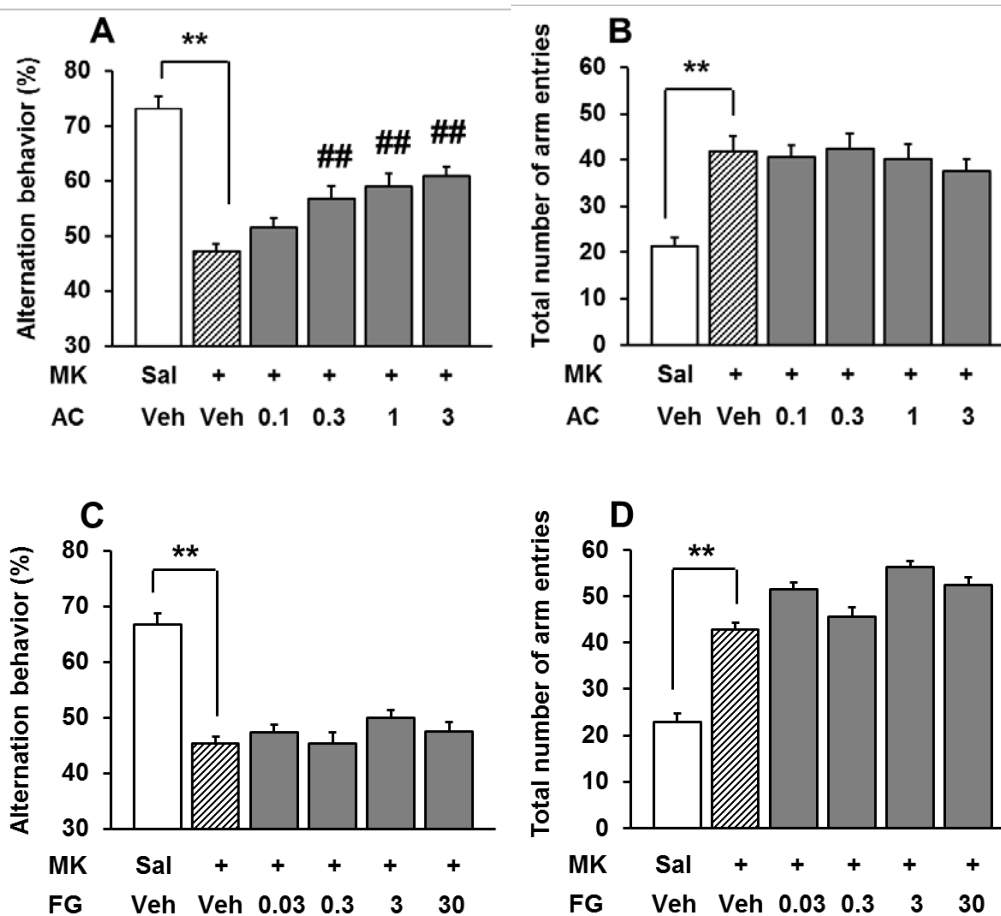


Fig. 15. Effect of co-administration of AC-3933 and donepezil on impairment of alternation behavior induced by scopolamine in mice. V: vehicle (0.5% tragacanth gum in water) + physiological saline. S: vehicle + scopolamine (0.6 mg/kg, s.c.). AC-3933 (0.01-1 mg/kg, p.o.) and donepezil (3 mg/kg, p.o.) were mixed, and the mixture was orally administered to mice 90 min prior to the test. Scopolamine was injected 30 min prior to the test. Each column represents the mean \pm SEM. $n = 6$. ** $p < 0.01$: vehicle -treated group vs. scopolamine-treated group (Wilcoxon rank sum test). ## $p < 0.01$: scopolamine-treated group vs. AC-3933 alone group (non-parametric Dunnett's multiple comparison test). † $p < 0.05$: scopolamine-treated group vs. concomitant administration group (non-parametric Dunnett's multiple comparison test).

2-4 MK-801 誘発記憶障害改善作用

2-4-1 マウス Y 字型迷路試験

MK-801 (0.1 mg/kg) は、マウスの自発的交替行動を有意に減少させ (Fig. 16A, C, E)、全アーム侵入回数を有意に増加させた (Fig. 16B, D, F)。AC-3933 は、0.3、1 および 3 mg/kg の用量で MK-801 による自発的交替行動の減少を有意に回復させた (Fig. 16A)。一方、BZR インバースアゴニスト FG-7142 は、0.03 から 30 mg/kg の用量範囲において、また、donepezil は 5 から 15 mg/kg の用量範囲において MK-801 による空間作業記憶障害を改善しなかった (Fig. 16C, E)。MK-801 による全アーム侵入回数の増加に対して、AC-3933 および FG-7142 は全く影響をおよぼさなかった (Fig. 16B, D) が、donepezil は試験に用いた最大用量 (15 mg/kg) において有意に減少させた (Fig. 16F)。



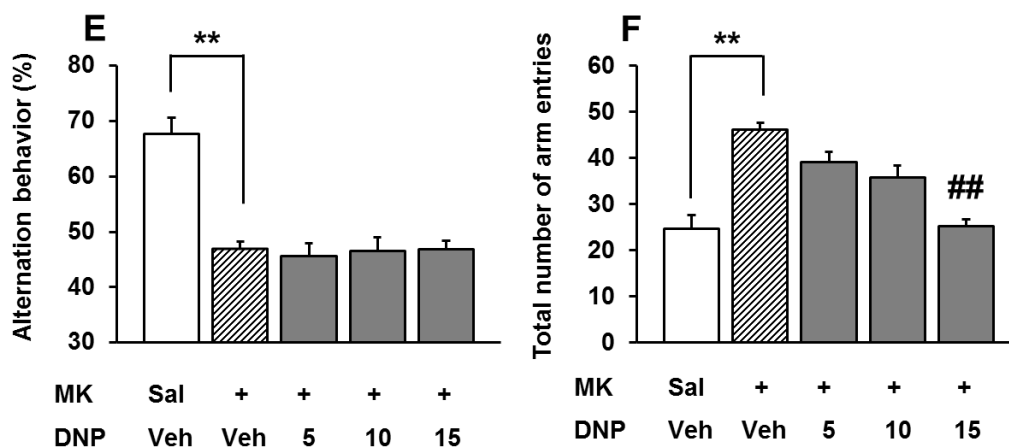
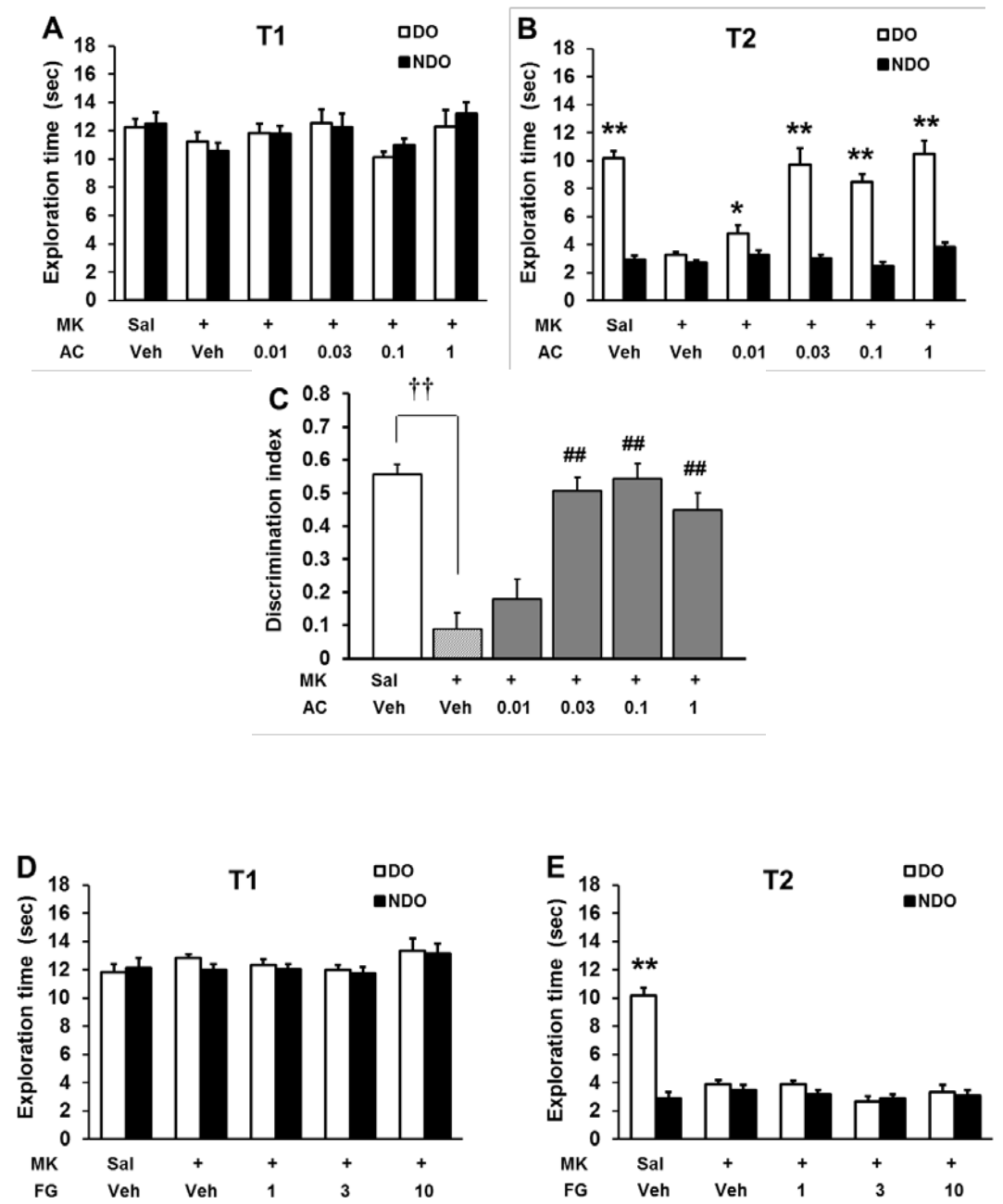


Fig. 16. Effects of AC-3933, FG-7142 and donepezil on MK-801-induced impairment of spontaneous alternation behavior in the Y-maze test in mice. A, C and E: % of alternation behavior. B, D and F: total number of arm entries. AC-3933, FG-7142 or donepezil was orally given to mice 90 min prior to the test. MK-801 was subcutaneously injected to mice 30 min prior to the test. MK: MK-801 (0.1 mg/kg, s.c.). AC: AC-3933 (0.1-3 mg/kg, p.o.). FG: FG-7142 (0.03-30 mg/kg, p.o.). DNP: donepezil (5-15 mg/kg, p.o.). Sal: physiological saline. Veh: vehicle for AC-3933, FG-7142 and donepezil, 0.5% tragacanth gum in water. Each column represents the mean \pm SEM. $n=12$ per group. $**p<0.01$: vs. (Sal + Veh)-treated group (Wilcoxon rank sum test); $##p<0.01$: vs. (MK + Veh)-treated group (non-parametric Dunnett's multiple comparison test).

2-4-2 マウス物体位置記憶試験

第1試行における2つの物体（試験箱の中央に置いたDOとコーナーに置いたNDO）それぞれに対する探索時間はいずれの処置群においても差が無く（ $F_{11,108}=1.45$, $p=0.16$, Fig. 17A; $F_{9,90}=1.13$, $p=0.35$, Fig. 17D; $F_{9,90}=0.60$, $p=0.79$, Fig. 17G）、また、第1試行における両物体（DOおよびNDO）への全探索時間は処置群間で違いは認められなかった（ $F_{5,54}=1.68$, $p=0.16$, Fig. 17A; $F_{4,45}=1.27$, $p=0.30$, Fig. 17D; $F_{4,45}=0.71$, $p=0.59$, Fig. 17G）。これらの結果は、物体の位置の違いに対する嗜好性がないこと、そして被験物質処置による探索行動への影響がないことを意味している。第2試行において、溶媒処置マウスはNDOに比べDOへの探索時間が有意に長かった（ $F_{11,108}=33.94$, $p<0.01$, Fig. 17B; $F_{9,90}=31.92$, $p<0.01$, Fig. 17E; $F_{9,90}=35.62$, $p<0.01$, Fig. 17H; すべて post hoc paired t-test, $p<0.01$ ）。これに対し、MK-801（0.05 mg/kg）処置マウスは、DOへの探索時間がNDOへの探索時間とほぼ同程度であり、かつ第1試行での探索時間よりも短かった（Fig. 17B, E, H）。AC-3933処置マウスは、第2試行においてNDOよりもDOを有意に長く探索した（Fig. 17B）。一方、FG-7142および

donepezil 処置マウスはいずれも MK-801 処置マウスが示した DO および NDO への探索時間と同程度であった (Fig. 17E, H)。識別係数での評価において、いずれの試験においても MK-801 処置マウスは溶媒処置マウスに比べ有意に低値を示した ($F_{5,54}=17.80$, $p<0.01$, Fig. 17C; $F_{4,45}=28.48$, $p<0.01$, Fig. 17F; $F_{4,45}=24.02$, $p<0.01$, Fig. 17I; すべて post hoc Tukey's test, $p<0.01$)。AC-3933 は、0.03、0.1 および 1 mg/kg の用量において MK-801 処置による DI 値の低下を有意に回復させた (Fig. 17C)。一方、FG-7142 および donepezil は、MK-801 による DI 値の低下に対して回復効果が認められなかった (Fig. 17F, I)。



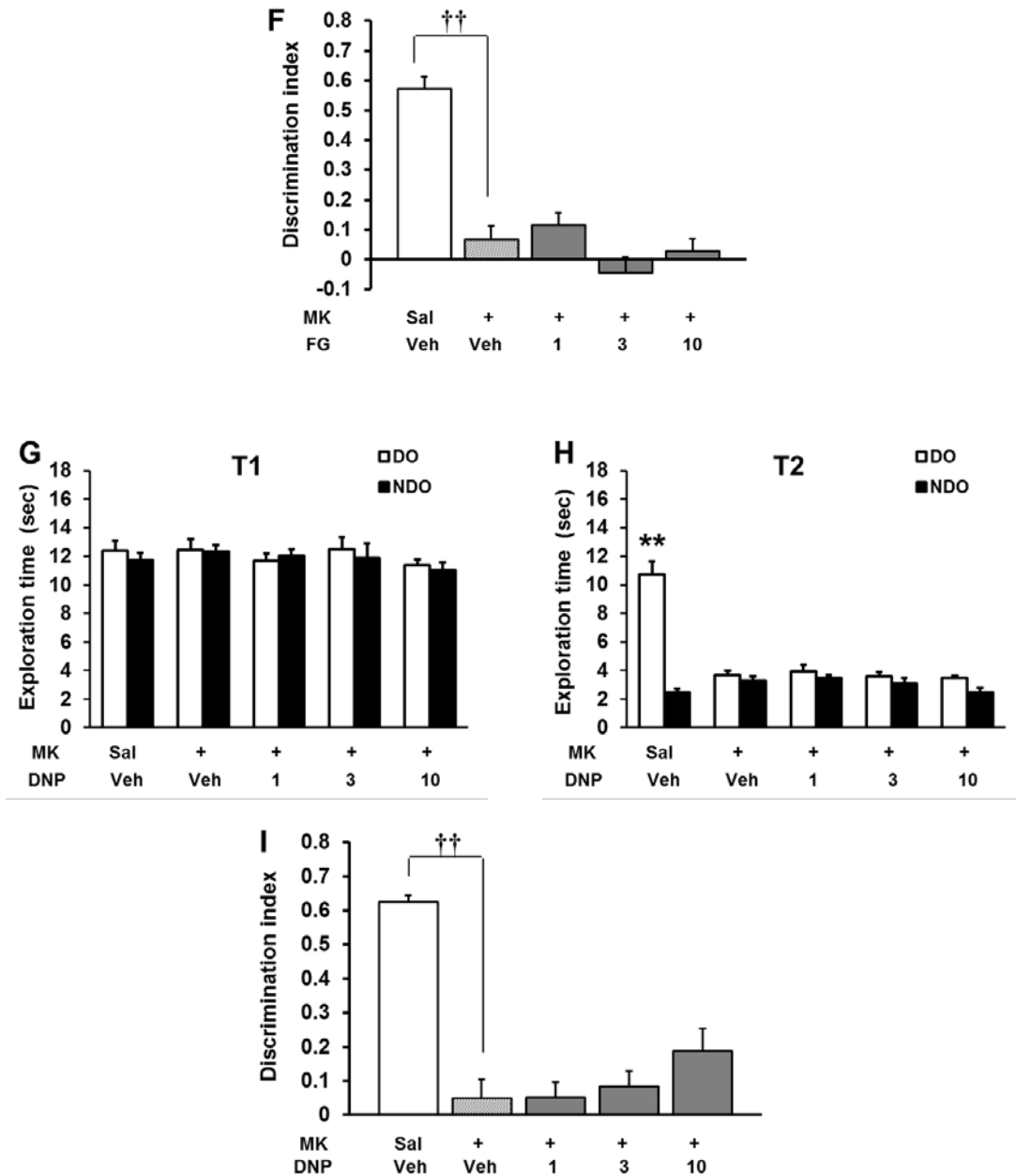


Fig. 17. Effects of AC-3933, FG-7142 and donepezil on MK-801-induced memory impairment in the object location test in mice. A, D and G: exploration time in the first trial (T1). B, E and H: exploration time in the second trial (T2). C, F and I: discrimination index. AC-3933, FG-7142 or donepezil was orally given to mice 60 min prior to T1. MK-801 was subcutaneously injected to mice 30 min prior to T1. MK: MK-801 (0.05 mg/kg, s.c.). AC: AC-3933 (0.01-1 mg/kg, p.o.). FG: FG-7142 (1-10 mg/kg, p.o.). DNP: donepezil (1-10 mg/kg, p.o.). Sal: physiological saline. Veh: vehicle for AC-3933, FG-7142 and donepezil, 0.5% tragacanth gum in water. Each column represents the mean \pm SEM. $n=10$ per group. $*p<0.05$, $**p<0.01$: DO vs. NDO (paired t-test); $\dagger\dagger p<0.01$: (Sal + Veh)-treated group vs. (MK + Veh)-treated group, $###p<0.01$: vs. (MK + Veh)-treated group (Tukey's multiple comparison test).

2-5 老齢マウスにおける認知機能増強作用

2-5-1 老齢マウス Y 字型迷路試験

老齢マウス（20 か月以上）46 匹を対象に群分け用データ取りのために AC-3933 無処置の条件で Y 字型迷路試験を行ったところ、平均自発的交替行動率は $59.2 \pm 1.8\%$ 、全アーム侵入回数は 18.0 ± 0.4 であった。この中より交替行動率の低いマウスを 24 匹選んだところ、薬効評価試験に用いた老齢マウスの自発的交替行動率は $49.5 \pm 1.7\%$ 、全アーム侵入回数は 17.8 ± 0.5 であった。AC-3933 は、0.05 および 0.1 mg/kg の用量にて全アーム侵入回数に影響を与えることなく、有意に老齢マウスの空間作業記憶力を増強した (Fig. 18A, B)。

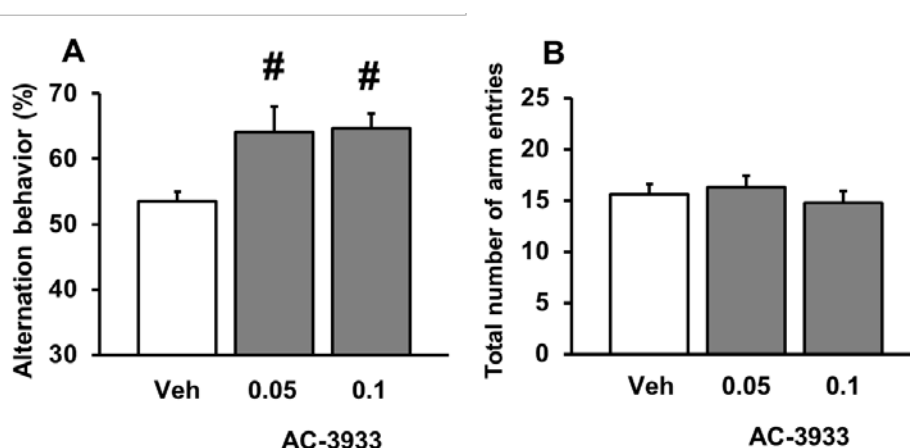


Fig. 18. Effects of AC-3933 on age-associated memory decline in the Y-maze test in mice. A: % alternation behavior; B: total number of arm entries. Veh: vehicle for AC-3933, 0.5% tragacanth gum in water. AC-3933 (0.05 and 0.1 mg/kg) was orally given to aged mice 60 min prior to the Y-maze test. Each column represents the mean \pm SEM. $n = 8$ per group. # $p < 0.05$, significantly different from the vehicle-treated group (non-parametric Dunnett's multiple comparison test).

2-5-2 老齢マウス新奇物体認識試験

老齢マウス（20 か月以上）43 匹を対象に群分け用データ取りのために AC-3933 無処置の条件で新奇物体認識試験を行ったところ、平均識別係数は 0.07 ± 0.03 であった。この中より識別係数の小さいマウスを 24 匹選んだところ、薬効評価試験に用いた老齢マウスの平均識別係数は -0.08 ± 0.02 であった。AC-3933 薬効評価試験において、溶媒および AC-3933 (0.05 および 0.1 mg/kg) 投与群の第 1 試行での平均探索時間は、それぞれ 18.9 ± 2.1 秒、 17.8 ± 1.9 秒、および 22.0 ± 1.5 秒であり、これらにおいて統計学的に有意な差は認められなかった ($F_{2,23}=1.37$, $p=0.276$)。このことは、AC-3933 処置がマウスの物体探索

行動に対し影響を与えなかったことを意味している。また、2物体間における探索時間の差は認められず ($F_{5,47}=1.03$, $p=0.415$)、物体に対する嗜好性は認められなかった。第2試行において、AC-3933 (0.05 mg/kg) 処置群では、新奇物体の探索時間が既知物体の探索時間より長い傾向が認められたが、各処置群における既知物体と新奇物体に対する探索時間において有意な差は認められなかった ($F_{5,47}=0.37$, $p=0.866$, Fig. 19A)。一方、識別係数において一元配置分散分析で有意な変化が認められ ($F_{2,23}=5.58$, $p=0.011$, Fig. 19B)、Dunnett 検定により、AC-3933 の 0.05 mg/kg 処置群において溶媒処置群に比べて有意な記憶増強効果が確認された (Fig. 19B)。

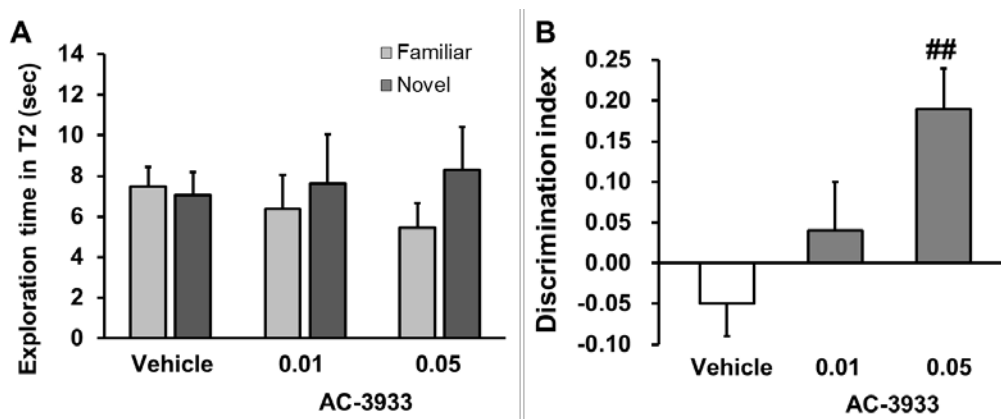


Fig. 19. Effects of AC-3933 on age-associated memory decline in the object recognition test in mice. (A) Exploration time in the second trial (T2). (B) Discrimination index. AC-3933 (0.01 and 0.05 mg/kg) was orally given to aged mice 60 min prior to the first trial (T1) of the object recognition test. Tests (T1 and T2) intertrial interval was 3 h. Each column represents the mean \pm SEM. $n = 8$ per group. $##p < 0.01$, significantly different from the vehicle-treated group (Dunnett's multiple comparison test).

3. 考察

近年、新薬の臨床開発の成功確度を高めるため、初期臨床試験段階においてバイオマーカーの変動を薬効予測の手段として用いる動きが増えてきている。残念ながら、中枢神経疾患では、治療効果を予測しうる生化学的バイオマーカーが極めて少ないが、一方で、脳波や脳磁図の測定、あるいは fMRI などを用いて治療薬候補の中枢での作用予測を行うという取り組みもある^{67,68,69)}。我々は、AC-3933 の認知症治療薬の可能性を探るため、ラット皮質脳波を測定し、周波数解析により認知症治療薬 donepezil との比較を行ったところ、6-8 Hz のパワーの増加が両剤の共通した脳波変化として認められた。この周波数帯域は θ 波帯域として分類され、ACh は θ 波を導出することが知られている^{70,71)}。また、 θ 波帯域の増加は注意機能の増強に関係すると報告されている⁷²⁾。これらのことから、AC-3933 は AChE 阻害薬と同様に中枢において ACh 神経系の活動を増強し、注意機能の亢進をもたらすと考えられる。

第 1 章では、AC-3933 が海馬切片からの高 K^+ 誘発 ACh 遊離を増強させることを明らかにした。また本章では、脳波評価により AC-3933 は脳内 ACh 神経系を賦活化する可能性が示唆された。そこで、in vivo マイクロダイアリシス法を用いて胃内投与後の脳内 ACh 遊離への影響について評価した。その結果、AC-3933 は用量依存的にラット海馬からの ACh 遊離を促進し、投与後 2 時間までの ACh 遊離濃度-時間曲線下面積は 10 mg/kg の用量において有意であった。このことから、AC-3933 は脳内 ACh 神経系を賦活化することが明らかになった。しかしながら、AC-3933 の ACh 遊離増強作用は 10 mg/kg の用量においても最大 175% までの増加でしかなく、文献にて報告されている AChE 阻害剤の ACh 増加作用に比べると小さいものであった^{71,73)}。これは、AC-3933 の ACh 遊離増強作用機序が AChE 阻害剤とは全く異なるものであり、また、安静時において ACh 神経系を過剰に興奮させないことを示唆している。事実、ACh 遊離促進作用が知られるセロトニン 4 受容体作動薬では、安静時よりも学習行動時においてより多くの ACh を遊離させることが報告されている⁷⁴⁾。GABA 神経系による抑制性の制御を弱める作用を有する AC-3933 においても、神経の活性化が必要な時に ACh 神経系の活性化をより強く引き起こす可能性が考えられ、この点については今後の検討課題である。

行動薬理的検討によって、AC-3933 は ACh 神経系の機能低下による認知機能障害 (scopolamine 誘発記憶障害)、Glu 神経系の機能低下による認知機能障害 (MK-801 誘発記憶障害) および老齢マウスにおける認知機能低下を改善することが明らかになった。現在認知症治療薬として臨床使用されている AChE 阻害剤 (例えば donepezil) は、その治療効果において十分満足いくものではなく、対症療法剤にはより効果の強い薬剤が望まれて

いる^{75, 76)}。アルツハイマー病患者の死後脳研究では、前脳基底核における ACh 神経系の変性が認められているが^{51, 77)}、加えて、Glu 神経系、特に NMDA 受容体を介した神経伝達系の機能不全も海馬や皮質において認められる^{78, 79)}。今回の検討において、AC-3933 は scopolamine 誘発記憶障害のみならず、donepezil では全く効果が認められなかった MK-801 誘発記憶障害に対しても改善効果を示した。このことは、AC-3933 は従来の認知症治療薬よりもより治療効果の高い対症療法剤になる可能性を示している。さらに、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤は消化器系の副作用により投与量を増やすことは難しく、このことも治療満足度を下げる要因の一つとして考えられている⁸⁰⁾。AC-3933 はオフターゲット探索においてアセチルコリンエステラーゼ阻害作用は持たないことが明らかにされている（第 1 章参照）。したがって、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤単剤での治療効果が十分でなく、副作用懸念のためより高用量のアセチルコリンエステラーゼ阻害剤が使用できない場合、AC-3933 を追加投与することによってより強い治療効果をもたらすことが期待できる。実際、我々は有効用量に満たない donepezil と AC-3933 の併用がより強い記憶障害改善作用を示すことを明らかにした。今回の結果は、AC-3933 が認知症治療薬として単剤での使用のみならず、他の治療薬との併用剤としても使用できることを示唆している。

中程度から重症のアルツハイマー病治療薬として臨床使用されている NMDA 受容体拮抗薬である memantine は、過剰な Glu による神経細胞死の誘導を抑制する効果が報告されている^{55, 56)}。つまり、NMDA 受容体への直接の刺激や Glu の過剰な遊離は神経細胞死誘導の原因となる可能性があり、アルツハイマー病の治療薬としては適切ではないと予想される。AC-3933 は、オフターゲット評価において NMDA 受容体あるいはグリシン結合部位やポリアミン結合部位といった NMDA 受容体の活性調節部位への結合親和性は持たないことが明らかになっている（第 1 章参照）。加えて、*in vivo* マイクロダイアリシス法において Glu の遊離亢進作用を示さないことが我々の予備検討において示唆されている。従って、AC-3933 は Glu 神経系の機能不全による記憶障害を改善するものの、NMDA 受容体に対して直接刺激する可能性や過剰に Glu を遊離させる可能性は低く、この点において神経細胞死誘導の懸念はないと考える。

物体位置記憶試験では、二つの同形の物体をあらかじめマウスに記憶させておき、次にひとつの物体の位置を変えて再び探索させた。通常、マウスは新奇な物体に対して興味を持ち既知の物体よりも探索時間が長くなる傾向がある。このため、物体の位置の変化が認識できていればマウスは位置を変えた物体（DO）に新奇性を感じ、位置を変えない物体（NDO）よりも長く探索する⁸¹⁾。MK-801 処置マウスでは、物体の位置の記憶が障害され

るため DO の位置の変化が認識できない⁸²⁾。我々の検討においても、DO と NDO の探索時間に差が認められず、位置の記憶ができていないことが示唆された。興味深いことに、MK-801 処置マウスの両物体の探索時間は第 1 試行時に比べて短かった。このことは、マウスが物体そのものに新奇性を感じていないことを示唆しており、すなわち物体そのものの記憶は障害されていないと推察される。今回の結果は、Glu 神経系が特に空間認知において重要な役割を果たしていることを示唆しており、アルツハイマー病患者における空間認知能力の低下に対し、AC-3933 は donepezil 以上の治療効果を示すことが期待できる。

第3章 AC-3933 の認知機能障害改善作用機序に関する検討

AC-3933 の認知機能障害改善作用の作用機序について推定するために、ベンゾジアゼピン受容体 (BZR) アンタゴニストである flumazenil を用いて、AC-3933 の scopolamine 誘発記憶障害改善作用および MK-801 誘発記憶障害改善作用の拮抗試験を行った。

1. 実験材料と実験方法

本章における動物を用いた試験は、すべて大日本住友製薬株式会社 研究本部動物実験委員会による承認を受け、実験動物取扱ガイドラインに従って実施した。

1-1 使用動物

雄性 ddY マウス (25-30 g) を日本エスエルシーより入手した。紙性床敷きを敷き詰めたプラスチック製のケージにマウスを 7-8 匹ずつ収容し、照明 (午前 7 時から午後 7 時まで点灯)、室温 (23±3°C)、湿度 (55±15%) が自動管理された動物室にて飼育した。エサ (日本クレア) および水は自由に摂取できるように与えた。入荷後、7 日以上の馴化期間をおき、その後実験に用いた。

1-2 使用薬物

AC-3933 および donepezil hydrochloride (donepezil) は大日本住友製薬 (株) 化学研究所にて合成した。この他、試験に用いた以下の化合物については Sigma-Aldrich より入手した: β -carboline-3-carboxylic acid methyl amide (FG-7142)、flumazenil、(-)-scopolamine hydrobromide (scopolamine) および (+)-MK-801 hydrogen maleate (MK-801)。

AC-3933、FG-7142 および donepezil は 0.5% トラガント溶液に、また flumazenil は、0.4% Tween 80 を含む生理的食塩液に懸濁した。Scopolamine および MK-801 は、生理的食塩液に溶解した。マウスにおける投与容量は、10 mL/kg とした。

1-3 Y 字型迷路試験

Y 字型迷路試験は、第 2 章 1-5 に記載した方法に準じて実施した。試験開始 90 分前 (作用発現時間の検討では 30 および 60 分前) に被験物質の経口投与を行い、記憶障害を惹起させるために scopolamine (0.6 mg/kg) あるいは MK-801 (0.1 mg/kg) を試験開始 30 分前に皮下投与した。Flumazenil は、試験開始 30 分前に腹腔内投与した。連続して異なるアームへ侵入した回数 (交替行動回数) を数え、以下の式により自発的交替行動率を算出した。

$$\{ \text{交替行動回数} / (\text{全アーム侵入回数} - 2) \}$$

1-4 物体位置記憶試験

物体位置記憶試験は第 2 章 1-6 に記載した方法に準じて実施した。第 1 試行開始 60 分前に被験物質の経口投与を行い、MK-801 (0.05 mg/kg) を第 1 試行開始 30 分前に皮下投与した。Flumazenil は第 1 試行開始 30 分前に腹腔内投与した。物体への探索行動は、物体のにおいを嗅ぐあるいは鼻で物体に触る行動と定義した。位置変更物体 (DO) と位置未変更物体 (NDO) の探索時間を以下の式に当てはめ識別係数 (DI) を算出した。

$$\{ (\text{DO の探索時間} - \text{NDO の探索時間}) / (\text{DO の探索時間} + \text{NDO の探索時間}) \}$$

1-5 統計解析

データは平均値と標準誤差 (SEM) で表記した。また、すべての統計解析は SAS[®] System を用いて実施した。

Y-maze test では、交替行動率または全アーム侵入回数について溶媒処置群と記憶障害群との比較あるいは記憶障害群と被験物質投与群との比較を Wilcoxon rank sum test、被験物質投与群と flumazenil 処置群との間で non-parametric Dunnett 型多重比較試験を用いて解析した。

物体位置試験では、第 1 試行において異なる位置に置いた物体に対する嗜好性を評価するために、各処置群のそれぞれの物体に対する探索時間について反復測定二元配置分散分析にて検定した。また、第 1 試行において被験物質の投与が動物の探索行動に影響しているか否かについて評価するために、各処置群の 2 物体に対する全探索時間について一元配置分散分析を行った。さらに、第 2 試行における DO と NDO に対する探索時間について反復測定二元配置分散分析を行った後、paired t-test を用いて解析した。識別係数については、一元配置分散分析を行った後 Tukey 型多重比較試験にて解析した。有意水準はすべて両側 5% とした

2. 実験結果

2-1 Scopolamine 誘発記憶障害改善作用機序

Y 字型迷路試験において、マウスの空間作業記憶に対し flumazenil 単独処置 (5、20、および 50 mg/kg, i.p.) は影響をおよぼさなかった (data not shown)。

第 2 章にて報告した結果と同様、マウス Y 字型迷路試験において AC-3933 は 0.3 mg/kg の用量で有意に scopolamine による空間作業記憶障害を改善した (Fig. 20A)。Flumazenil は用量依存的に AC-3933 の作用を拮抗し、20 mg/kg 処置において統計学的に有意差が認められた (Fig. 20A)。BZR インバーシアゴニスト FG-7142 は 3 mg/kg の用量で有意に scopolamine による空間作業記憶障害を改善し、その作用も flumazenil (20 mg/kg, i.p.) によって有意に拮抗された (Fig. 20B)。一方、donepezil (10 mg/kg, p.o.) による scopolamine 誘発空間作業記憶障害改善作用は、50 mg/kg の flumazenil においても減弱されなかった (Fig. 20C)。

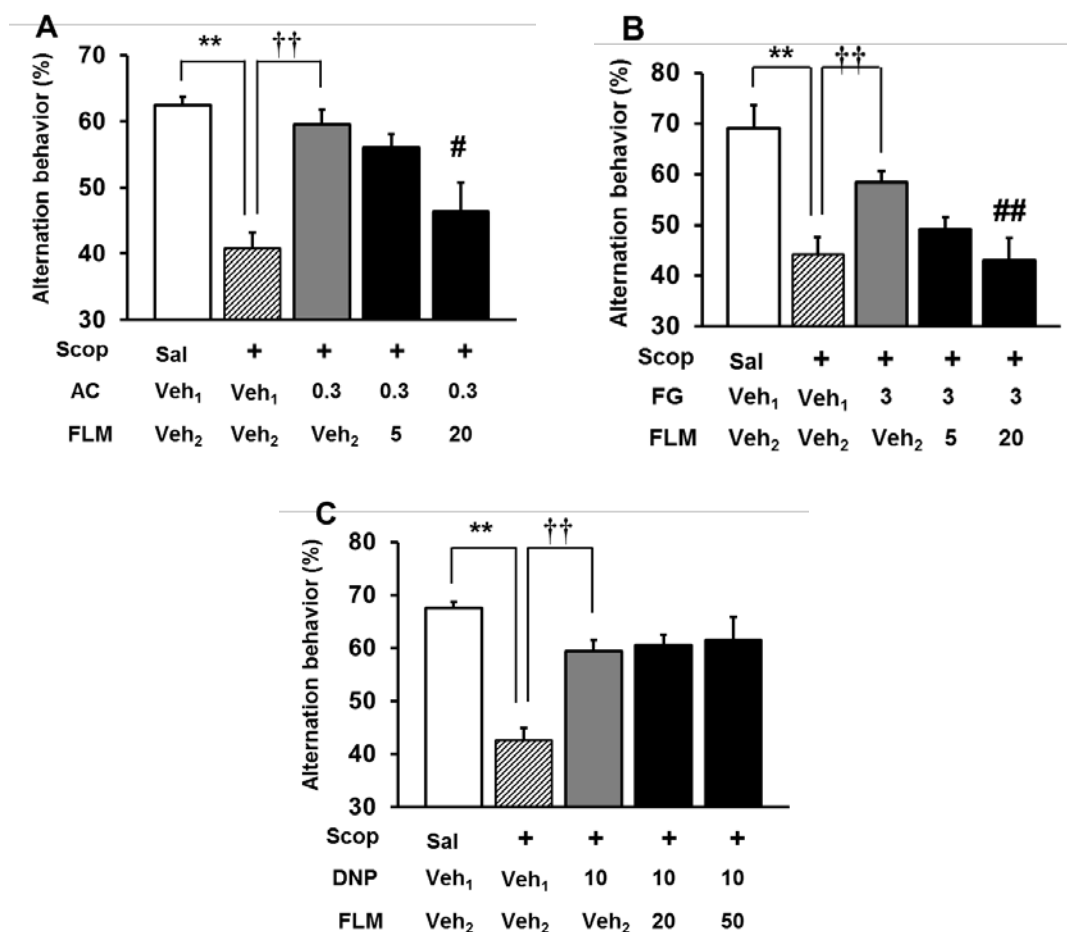


Fig. 20. Effect of flumazenil on AC-3933- (A), FG-7142- (B) and donepezil- (C) induced restoration of scopolamine-induced amnesia in the Y-maze test in mice. Scop: scopolamine (0.6

mg/kg, s.c.). AC: AC-3933 (0.3 mg/kg, p.o.). FG: FG-7142 (3 mg/kg, p.o.). DNP: donepezil (10 mg/kg, p.o.). FLM: flumazenil (A, B: 5 and 20 mg/kg, i.p., C: 20 and 50 mg/kg, i.p.). Sal: physiological saline. Veh₁: vehicle for AC-3933 and donepezil, 0.5% tragacanth gum in water. Veh₂: vehicle for flumazenil, 0.4% Tween 80 in physiological saline. Each column represents the mean ± SEM. n = 12 (A), 8 (B) and 9-10 (C) per group. ***p*<0.01: vs. (Sal + Veh)-treated group, ††*p*<0.01: vs. (Scop + Veh₁)-treated group (Wilcoxon rank sum test). #*p*<0.05, ##*p*<0.01: vs. (Scop + AC/FG/DNP)-treated group (non-parametric Dunnett's multiple comparison test).

2-2 MK-801 誘発記憶障害改善作用機序

2-2-1 Y字型迷路試験

第2章にて報告した結果と同様、マウス Y 字型迷路試験において AC-3933 は 0.3 mg/kg の用量で有意に MK-801 による空間作業記憶障害を改善したが、この作用は flumazenil (20 mg/kg, i.p.) によって拮抗されなかった (Fig. 21A)。MK-801 処置により有意に増加した総アーム侵入回数に対して、AC-3933 および flumazenil による影響は認められなかった (Fig. 21B)。

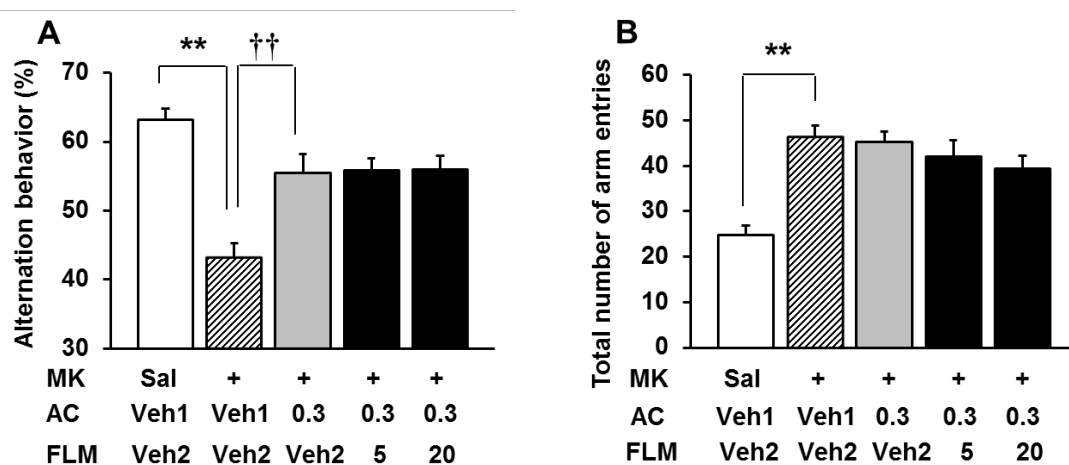


Fig. 21. Effect of flumazenil on the beneficial action of AC-3933 on MK-801-induced impairment of spontaneous alternation behavior in the Y-maze test in mice. A: % alternation behavior; B: total number of arm entries. AC-3933 was orally given to mice 90 min prior to the test. Flumazenil, given intraperitoneally, and MK-801, given subcutaneously, were injected to mice 30 min prior to the test. MK: MK-801 (0.1 mg/kg, s.c.). AC: AC-3933 (0.3 mg/kg, p.o.). FLM: flumazenil (5 and 20 mg/kg, i.p.). Sal: physiological saline. Veh₁: vehicle for AC-3933, 0.5% tragacanth gum in water. Veh₂: vehicle for flumazenil, 0.4% Tween 80 in physiological saline. Each column represents the mean ± SEM. n=12 per group. ***p*<0.01: vs. (Sal + Veh₁ + Veh₂)-treated group, ††*p*<0.01: vs. (MK + Veh₁ + Veh₂)-treated group (Wilcoxon rank sum test).

2-2-2 物体位置記憶試験

マウス物体位置記憶試験において、第1試行における処置群ごとのDOおよびNDOに対する探索時間 ($F_{9,90}=1.09$, $p=0.38$, Fig. 22A)、および各処置群間の全探索時間 ($F_{4,45}=1.33$, $p=0.27$, Fig. 22A) において有意な変化は認められなかった。第2試行において、各処置群におけるDOとNDOそれぞれに対する探索時間の間に有意な変化が認められ ($F_{9,90}=36.49$, $p<0.01$, Fig. 22B)、溶媒処置群、AC-3933 処置群およびAC-3933 と flumazenil 処置群においてDOに対する探索時間がNDOに対する探索時間よりも有意に長かった (Fig. 22B)。また、MK-801 処置群はDOおよびNDOに対する探索時間がほぼ同等であり、かつ第1試行における探索時間よりも短かったことから、物体の記憶は障害を受けることなく位置の記憶が障害されていることが再現された (第2章参照)。識別係数において、AC-3933 は0.1 mg/kgの用量でMK-801 処置によって認められたDI値の低下を有意に回復させたが、このAC-3933の作用はflumazenilによって拮抗されなかった (Fig. 22C)。

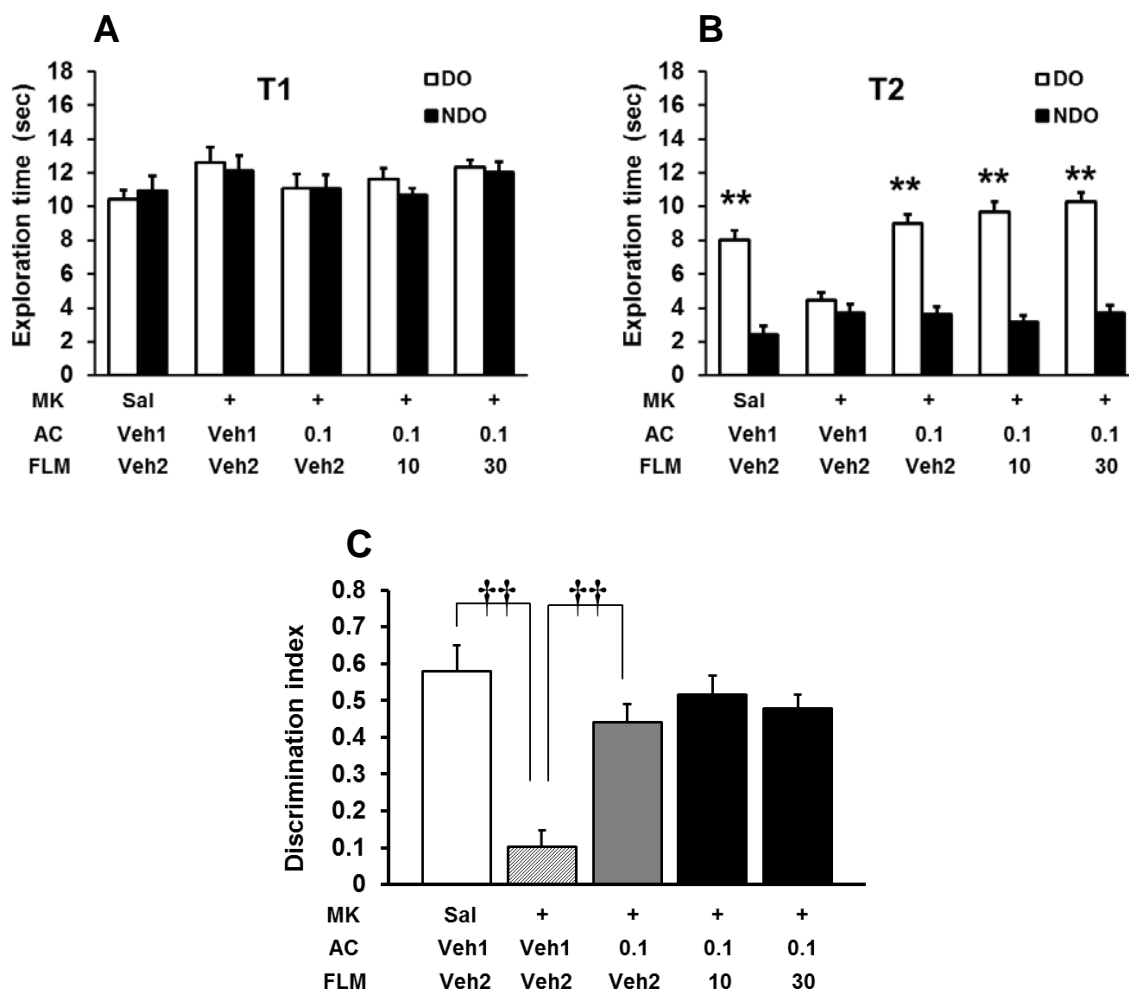


Fig. 22. Effect of flumazenil on the beneficial action of AC-3933 on MK-801-induced memory impairment in the object location test in mice. A: exploration time in the first trial (T1); B: exploration time in the second trial (T2); C: discrimination index. AC-3933 (0.1 mg/kg) was orally

given to mice 60 min prior to T1. Flumazenil, given intraperitoneally, and MK-801, given subcutaneously, were injected to mice 30 min prior to T1. MK: MK-801 (0.05 mg/kg, s.c.). AC: AC-3933 (0.1 mg/kg, p.o.). FLM: flumazenil (10 and 30 mg/kg, i.p.). Sal: physiological saline. Veh1: vehicle for AC-3933, 0.5% tragacanth gum in water. Veh2: vehicle for flumazenil, 0.4% Tween[®] 80 in physiological saline. Each column represents the mean \pm SEM. n=10 per group. ** p <0.01: DO vs. NDO (paired t-test); †† p <0.01: (Sal + Veh1 + Veh2)-treated group vs. (MK + Veh1 + Veh2)-treated group and (MK + Veh1 + Veh2)-treated group vs. (MK + AC + Veh2)-treated group (Tukey's multiple comparison test).

2-3 AC-3933 の記憶障害改善作用発現時間の比較

AC-3933 の scopolamine 誘発記憶障害改善作用機序および MK-801 誘発記憶障害改善作用機序の違いについて作用発現時間から検証する目的で、投与から試験までの時間を変えて Y 字型迷路試験を行った。AC-3933 (1 mg/kg) をマウスへ経口投与し、30 分あるいは 60 分後に Y 字型迷路試験を実施したところ、scopolamine 誘発記憶障害はいずれの処置時間においても明確に改善されたが、MK-801 誘発記憶障害に対しては 30 分処置では十分な改善が認められず、投与後 60 分にて有意な改善作用が認められた (Fig. 23)。

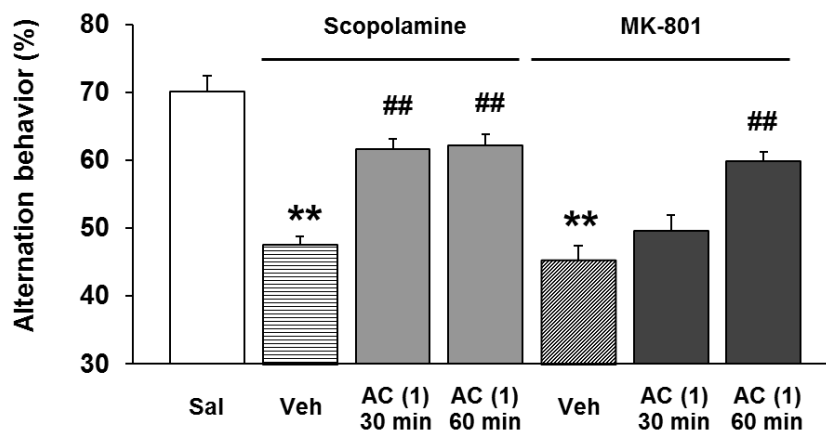


Fig. 23. Onset of the beneficial effects of AC-3933 on scopolamine- and MK-801-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. AC-3933 (1 mg/kg) was orally given to mice 30 or 60 min prior to the Y-maze test. Scopolamine (0.6 mg/kg) or MK-801 (0.1 mg/kg) was injected subcutaneously to mice 30 min prior to the Y-maze test. AC: AC-3933 (1 mg/kg, p.o.). Sal: physiological saline. Veh: vehicle for AC-3933, 0.5% tragacanth gum in water. Each column represents the mean \pm S.E.M. n=10 per group. ** p <0.01: vs. Sal-treated group (Wilcoxon rank sum test); ## p <0.01: vs. (Scop/MK + Veh)-treated group (non-parametric Dunnett's multiple comparison test).

3. 考察

BZR インバースアゴニストは、海馬や皮質における GABA による抑制性の制御を減弱させることによってさまざまな神経系の活動性を高めることが知られている^{16,83)}。これまでの章で、AC-3933 は BZR パーシャルインバースアゴニストとしての性質を有しており、加齢に伴う認知機能低下に対する回復効果や ACh 神経系および Glu 神経系の機能低下による記憶障害を改善することを報告した。本章では、AC-3933 の ACh 神経系もしくは Glu 神経系の機能低下による記憶障害の改善作用機序を明らかにする目的で、BZR アンタゴニストである flumazenil による拮抗試験を行い、その結果について報告した。Flumazenil は、in vivo 試験において BZR アゴニストやインバースアゴニストの作用を拮抗するために汎用されている。Murata ら⁸⁴⁾によると、flumazenil はムスカリン様 ACh 受容体に対する親和性は持たない選択的な BZR アンタゴニストであることが報告されている。また、我々は flumazenil 自体が Y 字型迷路試験で記憶障害を惹起させないことを確認している。Y 字型迷路試験において、AC-3933 の scopolamine 誘発記憶障害改善作用は flumazenil によって拮抗され、同様に BZR インバースアゴニスト FG-7142 の scopolamine 誘発記憶障害改善作用も flumazenil によって拮抗された。これらの結果は、AC-3933 の ACh 神経系の機能低下による記憶障害改善作用機序において BZR が関与していることを強く示唆するものである。今後、AC-3933 の記憶障害改善作用機序をより詳細に検討するために、BZR 結合部位を含めた GABA 受容体サブユニットの遺伝子改変動物などを用いた評価が有用である^{85,86)}。一方、donepezil による scopolamine 誘発記憶障害改善作用は flumazenil によって影響を受けなかった。このことは、donepezil の ACh 神経系機能低下に起因する記憶障害の改善作用機序において BZR が関与していないことを示している。

AC-3933 が改善した Glu 神経系の機能低下による記憶障害に対して、FG-7142 では改善しない可能性が示された（第 2 章参照）。さらに AC-3933 の MK-801 誘発記憶障害改善作用は flumazenil によって拮抗されなかった。同用量の flumazenil によって、AC-3933 の scopolamine 誘発記憶障害改善作用は拮抗されたことから、拮抗試験における用量不足である可能性は低い。よって、これらの結果は AC-3933 の MK-801 誘発記憶障害改善作用機序に BZR 以外のターゲットが関与していることを示唆している。マウス Y 字型迷路試験において MK-801 誘発記憶障害はシグマ受容体リガンドにより改善されるという報告がある^{59,60)}。また、estrogen が NMDA 受容体を介したシグナル伝達機能を亢進させ、空間記憶の増強効果を示すという報告がある⁸⁷⁾。さらに、nicotine が MK-801 誘発空間作業記憶障害を改善するという報告もある⁸⁸⁾。しかしながら AC-3933 はオフターゲット評価によってこれらの受容体には親和性を持たないことが明らかになっている（第 1 章参照）こ

とから、AC-3933 の MK-801 誘発記憶障害改善作用機序にこれらの受容体が関与している可能性は低い。興味深いことに、AC-3933 のスコポラミン誘発記憶障害改善作用と MK-801 誘発記憶障害改善作用の作用発現時間には 30 分程度のずれがあることが明らかになった。薬物動態学的評価により、AC-3933 (5 mg/kg) をマウスへ経口投与した場合、投与後 30 分において最大血中濃度 (フリー体濃度換算で約 150 nM) に到達し、その後は一層性に血中より消失することが明らかになっている (血中消失半減期 1.2 時間)。薬効発現時の投与量と血中濃度との間に線形性があると仮定すると、1 mg/kg の用量で AC-3933 を経口投与した場合、30 分後における血中フリー体濃度は約 30 nM と推定される。AC-3933 の BZR への結合親和性 (Ki 値 ; 5.15 nM) から考えると、投与後 30 分において生体内には AC-3933 が BZR を介して薬効を発現するに十分な量が存在していると予想される。MK-801 誘発記憶障害改善作用が flumazenil によって拮抗されなかったこと、および scopolamine 誘発記憶障害改善作用と MK-801 誘発記憶障害改善作用の発現時間が異なることは、AC-3933 の認知機能障害作用に複数の作用機序が関与している可能性を示唆するものである。今後、詳細な検討により明らかにすべき課題である。

第4章 ベンゾジアゼピン受容体インバースアゴニスト作用による副作用に関する検討

ベンゾジアゼピン受容体 (BZR) インバースアゴニストは、GABA 神経系の働きを抑制するため種々の神経系の活動性を高める。このため、固有活性の高い BZR インバースアゴニストは GABA 神経系による抑制制御を強く抑制し、痙攣や不安を惹起することが知られている^{30, 89, 90)} (Fig. 3)。一方で、固有活性の低い BZR パーシャルインバースアゴニストは、固有活性の高い BZR フルインバースアゴニストの有する副作用を回避しつつ、ACh 神経系の活動性を増幅させ、認知障害改善効果が期待される^{27, 29, 91, 92)}。

第1章において、AC-3933 は固有活性の低い BZR パーシャルインバースアゴニストであることが明らかになった。本章では、AC-3933 の中枢神経系由来の副作用発現の可能性を評価するために、まず経口投与した AC-3933 の脳内 BZR 占拠率を *in vivo* 受容体試験によって明らかにした後、BZR インバースアゴニスト作用に起因する代表的な中枢神経系の副作用（不安惹起・痙攣惹起）について行動薬理学的手法を用いて検討した。

1. 実験材料と実験方法

本章における動物を用いた試験は、すべて大日本住友製薬株式会社 研究本部動物実験委員会による承認を受け、実験動物取扱ガイドラインに従って実施した。

1-1 使用動物

雄性 ddY マウス (16-18 g) を日本エスエルシーより入手した。紙性床敷きを敷き詰めたプラスチック製のケージにマウスを 7-8 匹ずつ収容し、照明（午前 7 時から午後 7 時まで点灯）、室温 (23±3°C)、湿度 (55±15%) が自動管理された動物室にて飼育した。エサ (CE-2, 日本クレア) および水は自由に摂取できるように与えた。入荷後、5-12 日の馴化期間をおき、その後実験に用いた。

1-2 使用薬物

AC-3933 は大日本住友製薬 (株) 化学研究所にて合成した。β-carboline-3-carboxylic acid methyl amide (FG-7142)、methyl β-carboline-3-carboxylate (β-CCM)、および flunitrazepam は Sigma-Aldrich より、³H]flumazenil は PerkinElmer Life Science Inc.より購入した。その他の必要な化合物は一般的な市販品を購入した。

In vivo 結合試験において、³H]flumazenil は生理的食塩液で希釈し、静脈内投与を行っ

た。Flunitrazepam は、0.4% Tween 80 含む生理的食塩液に溶解させた。経口投与を行う場合、AC-3933 および FG-7142 は 0.5% トラガント溶液に懸濁した。静脈内投与を行う場合、AC-3933 および β -CCM は 0.2 N 塩酸に溶解 (5 mg/kg 溶液) させた後、生理的食塩液で目的の濃度に希釈した。マウスにおける投与容量は、10 mL/kg とした。

1-3 In vivo 受容体結合試験

[³H]Flumazenil を用いた in vivo 受容体結合試験は、Atack ら⁹³⁾の方法に準じて行った。溶媒もしくは AC-3933 をマウスに経口投与し、55 分後に [³H]flumazenil (50 μ Ci/kg) を静脈内投与した。静脈内投与の 5 分後に脳を摘出し、脳重量の 14 倍量の 15 mM Krebs-Tris 緩衝液 ((in mM) NaCl (118)、KCl (4.8)、CaCl₂ (1.28)、1.2 mM MgSO₄ (1.2)、Tris-HCl (15)、pH 7.4) にてホモジネートした。組織ホモジネート (300 μ L) に 15 mM Krebs-Tris 緩衝液を加えて 1 mL とした後、GF/B グラスマイクロファイバーフィルターをセットしたセルハーベスター装置 (MB-48, Brandel) を用いて減圧濾過により B/F 分離した。フィルターは氷冷 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.7) 5 mL で 3 回洗浄したのち、バイアルに入れ、液体シンチレーションカクテル (ACS II, Amersham) 10 mL を加えて振とうした後、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 3100TR, Packard) を用いて放射活性を測定した。全結合量は溶媒処置後のマウス脳より得られた放射活性を用い、非特異的結合量には、flunitrazepam (10 mg/kg) を [³H]flumazenil 投与前 25 分に腹腔内投与したマウス脳より得られた放射活性を用いた。受容体占有率は以下の式で算出した。

受容体占有率

$$= \{1 - (\text{AC-3933 処置時の結合量} - \text{非特異的結合量}) / (\text{全結合量} - \text{非特異的結合量})\} \times 100$$

1-4 痙攣惹起試験

痙攣惹起作用は、被験物質投与後マウスにおけるミオクローヌス痙攣の有無で評価した。マウスに AC-3933、 β -CCM または溶媒 (0.08 N 塩酸を含む生理的食塩液) を静脈内投与し、投与後 30 分間、ミオクローヌス痙攣について観察した。さらに、AC-3933 については経口投与後 90 分間における痙攣惹起作用も観察した。

1-5 高架式十字迷路試験

不安様惹起作用は、高架式十字迷路試験を用いて評価した⁹⁴⁾。高架式十字迷路は、対称二方向のオープンアーム (長さ, 30 cm; 幅, 5 cm) およびクローズドアーム (長さ, 30 cm; 幅,

5 cm; 高さ, 15 cm)、そしてそれぞれのアームを上下左右で繋ぐ中央のプラットホーム(縦, 5 cm; 横, 5 cm) から構成されるの黒色プラスチック製の十字型形状をした迷路であり、床より 38.5 cm の高さにセッティングされた (Fig. 24)。AC-3933 および FG-7142 をマウスへ経口投与し、60 分後にプラットホーム上にオープンアームが前方に向くように置き、5 分間自由に探索行動させた。アームへの進入の定義は、四肢がすべて中央プラットホームから各アームに完全に侵入した状態とした。探索行動はビデオで撮影し、EthoVision 2.3 (Noldus Information Technology Inc., USA) を用いて解析した。オープンアーム進入割合とオープンアーム滞在時間の割合について以下の式により算出した。

$$\begin{aligned} \text{オープンアーム進入回数の割合 (\%)} &= \text{オープンアーム進入数} / \text{全アーム進入数} \times 100 \\ \text{オープンアーム滞在時間の割合 (\%)} &= \text{オープンアーム滞在時間 (秒)} / 300 \text{ (秒)} \times 100 \end{aligned}$$

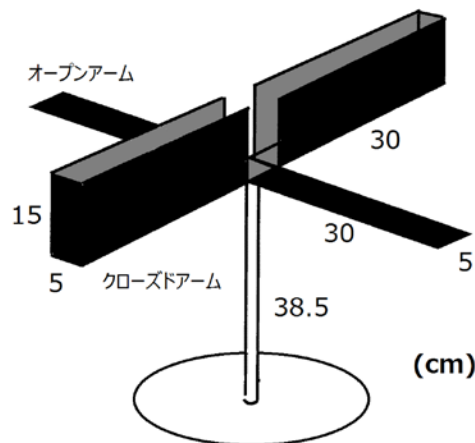


Fig. 24. 高架式十字迷路試験

1-6 統計解析

高架式十字迷路試験では、オープンアーム進入割合とオープンアーム滞在時間について、それぞれ溶媒処置群と被験物質処置群間での一元配置分散分析を行い、FG-7142 処置群においては Student's t-test を用いて統計解析を行った。すべて有意水準は両側 5%とした。

2. 実験結果

2-1 In vivo 受容体結合試験

AC-3933 を経口投与後の脳内 BZR 占拠率についてマウスを用いて検討したところ、AC-3933 は濃度依存的に $[^3\text{H}]$ flumazenil の結合を阻害し、100 mg/kg の用量では 91.1% の占拠率であった (Fig. 25)。

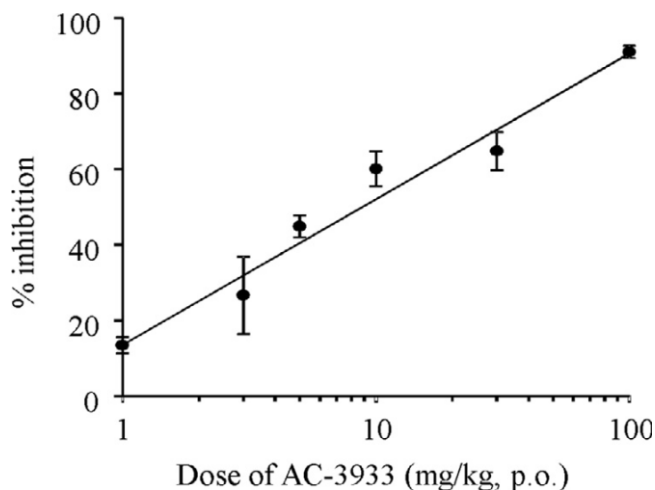


Fig. 25. Inhibition of in vivo binding of $[^3\text{H}]$ flumazenil by AC-3933. Mice were orally administered AC-3933 (1, 3, 5, 10, 30, 100 mg/kg) 55 min before the $[^3\text{H}]$ flumazenil intravenously injection. The data showing the % inhibition are expressed as mean \pm SEM. $n=3-4$ for each treatment group.

2-2 痙攣惹起試験

溶媒処置群において、ミオクローヌス痙攣を誘発するマウスは認められなかった (Table 3)。 β -CCM は、1 mg/kg の用量からミオクローヌス痙攣が認められ、投与量の増加と共に痙攣惹起個体数は増加した (Table 3)。一方、静脈内投与した AC-3933 は評価した最大用量 (20 mg/kg) においても痙攣惹起作用は認められなかった (Table 3)。また、経口投与では AC-3933 は 100 mg/kg の用量まで増量しても痙攣を惹起しなかった (Table 4)。

Table 3. AC-3933 potential for seizure after intravenous administration in mice.

Group	Number of mice with convulsion
Vehicle	0
AC-3933 (mg/kg)	
0.3	0
1	0
3	0
10	0
20	0
β -CCM (mg/kg)	
0.1	0
0.3	0
1	5
3	7
10	8

Mice were intravenously administered AC-3933 (0.3–20 mg/kg) or β -CCM (0.1–10 mg/kg) and observed for 30 min. n=10 for each treatment group.

Table 4. AC-3933 potential for seizure after oral administration in mice.

Group	Number of mice with convulsion
Vehicle	0
AC-3933 (mg/kg)	
3	0
10	0
30	0
100	0

Mice were orally administered AC-3933 (3–100 mg/kg) and observed for 90 min. n=10 for each treatment group.

2-3 高架式十字迷路試験

BZR インバーシアゴニストの FG-7142 (100 mg/kg, p.o.) は、マウスの高架式十字迷路におけるオープンアームへの進入回数を有意に減少させ、また、オープンアーム滞在時間を有意に減少させた (Fig. 26B, D)。一方、AC-3933 は 10 および 100 mg/kg (p.o.) の用量においてそれらの指標を減少させる傾向は認められたものの、その作用は有意なものではなかった (Fig. 26A, C)。

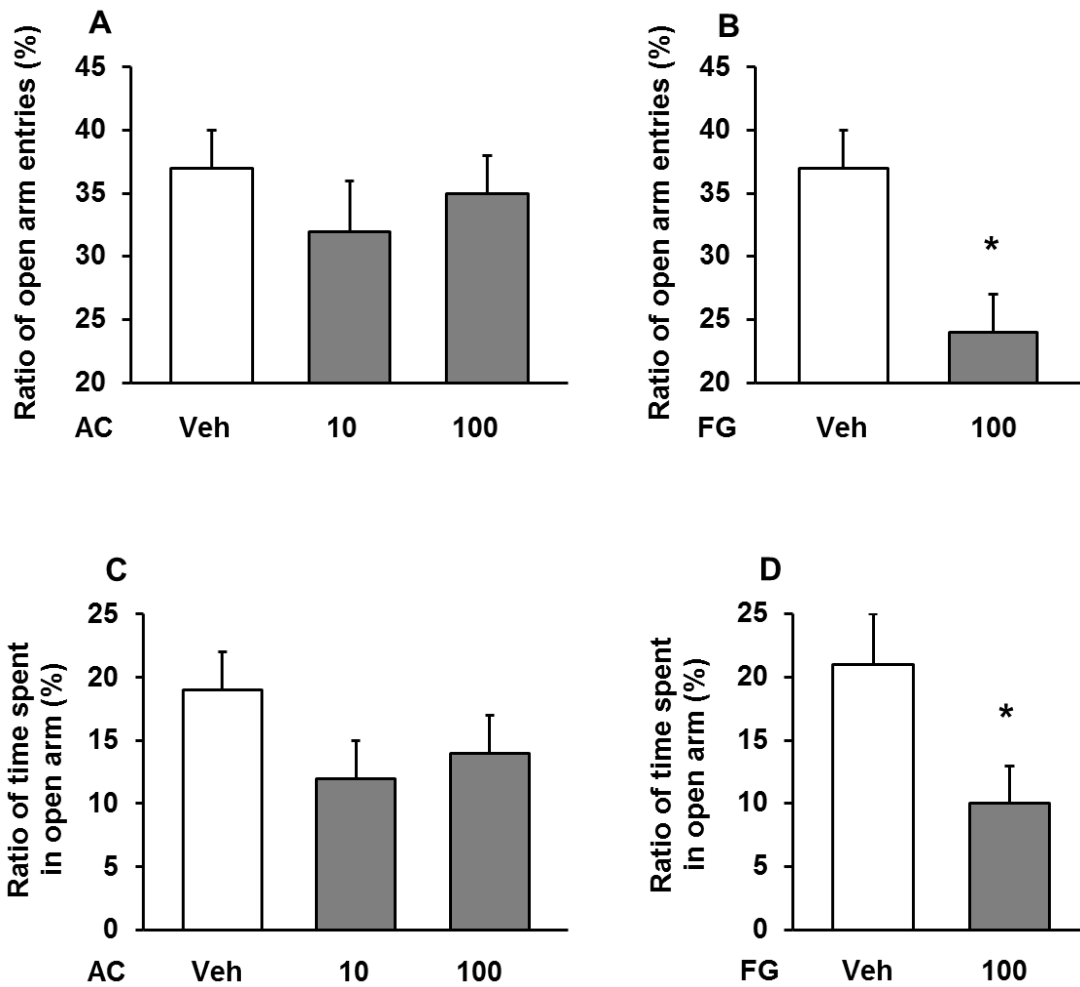


Fig. 26. Evaluation of AC-3933 and FG-7142 potential for anxiety in mice. AC-3933 (10, 100 mg/kg) or FG-7142 (100 mg/kg) was orally given to mice 60 min before elevated plus maze test. Effects of administration of AC-3933 (A) or FG-7142 (B) on the ratio of open arms entries are expressed as mean \pm SEM. Effects of AC-3933 (C) or FG-7142 (D) on the ratio of time spent in the open arms (%) to the total duration of the test session (5 min) are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. vehicle-treated group (Student's t-test). $n = 12-14$ for each treatment group.

3. 考察

AC-3933 の BZR インバースアゴニスト由来の中枢性副作用を評価するにあたって、まず評価する投与量で化合物が脳内に十分量移行しているか否かを明らかにしておく必要がある。このため、まず経口投与した AC-3933 の脳内 BZR 占拠率を *in vivo* 受容体結合試験によって評価した。今回試験に用いた最大経口投与量 (100 mg/kg) での AC-3933 の脳内 BZR 受容体占拠率は 91.1% であり、中枢性副作用を評価するには十分な脳内暴露があると考えられた。一方、AC-3933 のマウスを用いた行動薬理学的評価では 3 mg/kg 以下で有効性を示していることから、AC-3933 が薬効発現のために必要な脳内 BZR 占拠率は、25% 程度であっても十分である可能性が示された。

GABA の作用を減弱させる作用が強い (インバースアゴニストとして高固有活性) BZR フルインバースアゴニストは、痙攣惹起のリスクが報告されている⁹⁾。今回の検討においても、BZR フルインバースアゴニストである β -CCM は、1 mg/kg, *iv* よりマウスに痙攣を誘発させた。一方、AC-3933 は 20 mg/kg, *iv* もしくは 100 mg/kg, *po* の用量でもマウスに痙攣を誘発させなかった。加えて、本論文には掲載しなかったが、ラットにおいても AC-3933 は痙攣を誘発させなかったことから、AC-3933 の痙攣惹起リスクは極めて低いと予測される。 β -CCM に比べ AC-3933 の BZR インバースアゴニストとしての固有活性の低さが痙攣誘発リスクを下げているものと推察される。

不安様惹起作用の強さについては、マウス高架式十字迷路試験にて評価した。臨床試験において強い不安惹起作用が認められ、開発中止となった β -カルボリン誘導体の BZR インバースアゴニスト FG-7142^{96, 97)} を対照化合物として評価したところ、FG-7142 は 100 mg/kg, *po* の用量において有意な不安様作用が確認された。一方、AC-3933 は 100 mg/kg において不安様作用を示す傾向が認められたものの、その作用は有意なものではなかった。薬効用量との安全マージンによる評価では、AC-3933 はマウスにおける Y 字型迷路試験 (scopolamine 誘発記憶障害 / MK-801 誘発記憶障害) の最少有効用量は 0.3 mg/kg, *po*、物体位置記憶試験 (MK-801 誘発記憶障害) の最少有効用量は 0.03 mg/kg, *po*、そして老齢マウスにおける Y 字型迷路試験 / 物体認識試験の最少有効用量は 0.05 mg/kg, *po* であったことから、少なくとも 333 倍以上の安全マージンが担保できている。一方、FG-7142 は Y 字型迷路試験 (scopolamine 誘発記憶障害) での最少有効用量が 3 mg/kg, *po* であったことから安全マージンは 33 倍程度であると推定される。今回の結果から、AC-3933 の不安様惹起のリスクは FG-7142 に比べ低いと推察される。

総括

1906年にドイツの精神科医アロイス・アルツハイマーが最初のアルツハイマー病患者について報告してから110年が経過した。これまでに非常に多くの基礎研究・臨床研究が世界中で行われてきたが、病気の原因は今なお仮説レベルであり病気を完治させる薬剤（疾患修飾剤）は未だに存在しない。中核症状として認知機能障害が知られているが、認知機能障害改善薬として現在臨床使用されている薬剤はアセチルコリンエステラーゼ阻害剤4剤とNMDA受容体拮抗剤1剤のみであり、これら薬剤によるアルツハイマー病の治療満足度は極めて低いことから今なお新たな治療薬の登場が強く望まれている。しかしながら、これまで多くの治療薬候補の臨床開発が行われてきたが、アルツハイマー病治療薬の開発難易度は極めて高く、新薬の登場まで至っていない。

我々が探索研究の過程で見出してきた1,6-ナフチリジン誘導体のAC-3933は、BZRに対して高い親和性と選択性を有していた。また、BZR結合試験結果から算出されたGABA比の値やTBPS結合試験の結果から、パーシャルインバースアゴニストとしての性質を有することが明らかとなった。BZRインバースアゴニストは、抑制性の介在神経であるGABA神経系の活動を弱め、GABAによって抑制的に制御されている他の神経活動を高める作用が知られている。GABAによって抑制制御を受ける神経系のひとつに認知機能に関与することが知られているACh神経系があり、BZRインバースアゴニストはACh神経系の活動性を高めることにより認知機能を高めることがこれまでに報告されている。AC-3933はACh遊離促進作用や、海馬における長期増強現象の増強作用を示し、ムスカリン様ACh受容体拮抗薬scopolamineによる記憶障害を改善することが明らかになった。

一方で、BZRインバースアゴニストは、GABA神経系の抑制機能を解除することから、その固有活性の強いフルインバースアゴニストは痙攣惹起や不安惹起のリスクが知られている。痙攣惹起作用の対照薬にBZRフルインバースアゴニストの β -CCMを、また、不安様惹起作用の対照薬に臨床において強い不安惹起作用が確認されたBZRインバースアゴニストのFG-7142を用いて評価した。結果、AC-3933には不安様惹起作用や痙攣惹起作用が確認されず、十分安全マージンが担保できることが明らかになった。

AC-3933はアセチルコリンエステラーゼ阻害剤donepezilでは無効であったGlu神経系の障害（MK-801処置）による記憶障害も改善し、既存薬と比較して治療域が広い薬剤である可能性が示唆された。興味深いことに、MK-801誘発記憶障害改善作用は、FG-7142や我々の化合物ライブラリーの中で1,6-ナフチリジン誘導体以外のBZRインバースアゴニストでは認められなかったことから、AC-3933周辺化合物が有する特長であると考えら

れた。

AC-3933 の scopolamine 誘発記憶障害改善作用は、BZR アンタゴニスト flumazenil によって拮抗され、BZR を介した作用である可能性が示された。一方、MK-801 誘発記憶障害改善作用は flumazenil によって拮抗されなかったことに加え、scopolamine 誘発記憶障害改善作用と MK-801 誘発記憶障害改善作用とのオンセットにおいて違いがあることが明らかとなったことから、先の機序とは全く別の機序が関与していると推察される。この点については、今後さらに検討を重ねる必要がある。MK-801 誘発記憶障害改善作用機序の解明のため、我々は AC-3933 構造の一部にリンカーを付けた化合物において in vivo での MK-801 誘発記憶障害改善作用が保持されているものと保持されていないものを見出し、それら物質を結合させた Biacore センサーを用いて AC-3933 結合活性を確認しながら各種クロマトグラフィーを用いて MK-801 誘発記憶障害改善作用に関与し得る AC-3933 結合タンパクの精製・同定を試みてきた。これまでにラット脳可溶性画分より 2-3 の候補タンパクを見出してきており、それらに対する阻害剤を用いた in vivo での MK-801 誘発記憶障害改善作用の拮抗作用について検討を行っている。これらは新規な知見である可能性があり、新たな創薬ターゲットとなる可能性を秘めている。新しい薬を創製し、臨床現場に届けることは製薬会社としての責務であると考え、今後も継続して有望化合物を見出していきたい。

本研究内容は、以下の報告を基に作成した。

Hashimoto T, Kiyoshi T, Kohayakawa H, Iwamura Y, Yoshida N (2014) Pharmacological properties of AC-3933, a novel benzodiazepine receptor partial inverse agonist. *Neuroscience* 256:352-359.

Hatayama Y, Hashimoto T, Kohayakawa H, Kiyoshi T, Nakamichi K, Kinoshita T, Yoshida N. (2014) In vivo pharmacological characterization of AC-3933, a benzodiazepine receptor partial inverse agonist for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 265:217-225.

Hashimoto T, Hatayama Y, Nakamichi K, Yoshida N (2014) Procognitive effect of AC-3933 in aged mice, and synergistic effect of combination with donepezil in scopolamine-treated mice. *Eur J Pharmacol* 745:123-128.

Hashimoto T, Iwamura Y (2016) AC-3933, a benzodiazepine partial inverse agonist, improves memory performance in MK-801-induced amnesia mouse model. *Pharmacol Biochem Behav* 144:45-52.

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました福山大学大学院薬学研究科生化学教室 森田 哲生 教授に深甚なる謝意を表します。また、本論文作成に際し、有益なご助言とご高覧を賜りました福山大学大学院薬学研究科医薬品化学研究室 町支 臣成 教授、福山大学大学院薬学研究科分子免疫学研究室 今 重之 教授に深謝いたします。またこのような機会を与えて頂きました福山大学大学院薬学研究科薬物治療学教室 井上 敦子 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて頂きました旧大日本製薬株式会社 元医薬研究本部長 澤山 忠弘 博士、同 元薬理研究所長 現大日本住友製薬常勤監査役 古谷 泰治 博士、同 元創薬薬理第2研究グループマネージャー 吉田 直之 博士に深く感謝いたします。

また本研究にあたり、適切にご指導ならびに多大なるご助力を頂きました岡 真 博士、古川 清氏、久留宮 聰 博士、越智 喜昭氏、ならびに本研究にご協力を賜りました大日本住友製薬株式会社創薬開発研究所および先端薬理研究所の研究員の皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

- [1] World Health Organization (WHO), Media centre, Fact sheets (April 2016) “Dementia”.
- [2] Katzman R (1986) Alzheimer’s disease. *N Engl J Med* 314:964–973.
- [3] Perry RJ, Hodges JR (1999) Attention and executive deficits in Alzheimer’s disease. A critical review. *Brain* 122(Part 3):383–404.
- [4] Selkoe DJ (2001) Alzheimer’s disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741–766.
- [5] Marin DB, Swell MC, Schlechter A (2002) Alzheimer’s disease. Accurate and early diagnosis in the primary care setting. *Geriatrics* 57:36–40 (Quiz 43).
- [6] Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer’s disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383–388.
- [7] Kosik KS (1991) Alzheimer plaques and tangles: advances on both fronts. *Trends Neurosci* 14:218–219.
- [8] Carter J, Lippa CF (2001) Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer’s disease. *Curr Mol Med* 1:733–737.
- [9] Bartus RT (2000) On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 163:495–529.
- [10] Terry AVJr, Buccafusco JJ (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer’s disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development *J Pharmacol Exp Ther* 306:821–827.
- [11] Knapp MJ, Knopman DS, Solomon PR, Pendlebury WW, Davis CS, Gracon SI (1994) A 30-week randomized controlled trial of highdose tacrine in patients with Alzheimer’s disease. The Tacrine study group. *J Am Med Assoc* 271:985–991.
- [12] Farlow M, Gracon SI, Hershey LA, Lewis KW, Sadowsky CH, Dolan-Ureno JA (1992) Controlled trial of tacrine in Alzheimer’s disease. The Tacrine study group. *J Am Med Assoc* 268:2523–2529.
- [13] Tariot PN (2001) Maintaining cognitive function in Alzheimer disease: how effective are current treatments. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1:S26–S33.
- [14] Bullock R, Dengiz A (2005) Cognitive performance in patients with Alzheimer’s disease receiving cholinesterase inhibitors for up to 5 years. *Int J Clin Pract* 59:817–822.
- [15] Lipton SA (2005) The molecular basis of memantine action in Alzheimer’s disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism. *Curr Alzheimer Res* 2:155–165.
- [16] Schwartz RD (1988) The GABAA receptor-gated ion channel: biochemical and

- pharmacological studies of structure and function. *Biochem Pharmacol* 37:3369-3375.
- [17] Bormann J (1988) Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci* 11:112-116.
- [18] Haefely W, Kyburz E, Gereche M, Möhler H (1985) Recent advances in the molecular pharmacology of benzodiazepine receptors and in the structure–activity relationships of their agonists and antagonists. In: Testa B, editor. *Advances in drug research*, Vol. 14. London: Academic Press. p. 165–322.
- [19] Polc P (1988) Electrophysiology of benzodiazepine receptor ligands: multiple mechanisms and sites of action. *Prog Neurobiol* 31:349–423.
- [20] Christian CA, Herbert AG, Holt RL, Peng K, Sherwood KD, Pangratz-Fuehrer S, Rudolph U, Huguenard JR (2013) Endogenous positive allosteric modulation of GABAA receptors by diazepam binding inhibitor. *Neuron* 78:1063–1074.
- [21] Podhorna J, McCabe S, Brown RE (2002) Male and female C57BL/6 mice respond differently to diazepam challenge in avoidance learning tasks. *Pharmacol Biochem Behav* 72:13–21.
- [22] Whiting PJ (2006) GABA-A receptors: a viable target for novel anxiolytics? *Curr Opin Pharmacol* 6:24–29.
- [23] McMullan J, Sasson C, Pancioli A, Silbergleit R (2010) Midazolam versus diazepam for the treatment of status epilepticus in children and young adults: a meta-analysis. *Acad Emerg Med* 17:575–582.
- [24] Sieghart W (2006) Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes, In: Enna, S.J. (volume editor), *ADVANCES IN PHARMACOLOGY* vol. 54, San Diego, Academic Press, pp. 231-263.
- [25] Haefely WE, Martin JR, Richards JG, Schoch P (1993) The multiplicity of actions of benzodiazepine receptor ligands. *Can J Psychiatry* 38:S102–S108.
- [26] Teuber L, Wäjtjens F, Jensen LH (1999) Ligands for the benzodiazepine binding site – a survey. *Curr Pharm Des* 5:317–343.
- [27] Moore H, Sarter M, Bruno JP (1993) Bidirectional modulation of stimulated cortical acetylcholine release by benzodiazepine receptor ligands. *Brain Res* 627:267–274.
- [28] Abe K, Takeyama C, Yoshimura K (1998) Effects of S-8510, a novel benzodiazepine receptor partial inverse agonist, on basal forebrain lesioning-induced dysfunction in rats. *Eur J Pharmacol* 347:145–152.
- [29] Chorvat RJ, Zaczek R, Brown BS (1998) Ion channel modulators that enhance acetylcholine release: potential therapies for Alzheimer’s disease. *Expert Opin Investig Drugs* 7:499–518.
- [30] Gardner CR (1992) A review of recently-developed ligands for neuronal benzodiazepine

- receptors and their pharmacological activities. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 16:755–781.
- [31] Wood PL, Loo P, Braunwalder A, Yokoyama N, Cheney DL (1984) In vitro characterization of benzodiazepine receptor agonists, antagonists, inverse agonists and agonist/antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 231:572–576.
- [32] Bertz RJ, Reynolds IJ, Kroboth PD (1995) Effect of neuroactive steroids on [3H]flumazenil binding to the GABAA receptor complex in vitro. *Neuropharmacology* 34:1169–1175.
- [33] Serra M, Ghiani CA, Motzo C, Cuccheddu T, Floris S, Giusti P, Biggio G (1994) Imidazenil, a new partial agonist of benzodiazepine receptors, reverses the inhibitory action of isoniazid and stress on gamma-aminobutyric acidA receptor function. *J Pharmacol Exp Ther* 269:32–38.
- [34] Kar S, Issa AM, Seto D, Auld DS, Collier B, Quirion R (1998) Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 70:2179–2187.
- [35] Yamamoto M, Koshimura K, Kawaguchi M, Sohmiya M, Murakami Y, Kato Y (2000) Stimulating effect of erythropoietin on the release of dopamine and acetylcholine from the rat brain slice. *Neurosci Lett* 292:131–133.
- [36] Kawasaki K, Eigyo M, Ikeda M, Kihara T, Koike K, Matsushita A, Murata S, Shiomi T, Takada S, Yasui M (1996) A novel benzodiazepine inverse agonist, S-8510, as a cognitive enhancer. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiat* 20:1413-1425.
- [37] Möhler H, Richards JG (1981) Agonist and antagonist benzodiazepine receptor interaction in vitro. *Nature* 294:763–765.
- [38] Chiu TH, Rosenberg HC (1983) Conformational changes in benzodiazepine receptors induced by the antagonist Ro 15-1788. *Mol Pharmacol* 23:289–294.
- [39] Braestrup C, Nielsen M, Honoré T, Jensen LH, Petersen EN (1983) Benzodiazepine receptor ligands with positive and negative efficacy. *Neuropharmacology* 22:1451–1457.
- [40] Im WB, Blakeman DP (1991) Correlation between gammaaminobutyric acidA receptor ligand-induced changes in t-butylbicyclophosphoro[35S]thionate binding and ³⁶Cl⁻ uptake in rat cerebrocortical membranes. *Mol Pharmacol* 39:394–398.
- [41] Squires RF, Casida JE, Richardson M, Saederup E (1983) [35S]tbutylbicyclophosphorothionate binds with high affinity to brainspecific sites coupled to gamma-aminobutyric acid-A and ion recognition sites. *Mol Pharmacol* 23:326–336.
- [42] Gee KW, Lawrence LJ, Yamamura HI (1986) Modulation of the chloride ionophore by benzodiazepine receptor ligands: influence of gamma-aminobutyric acid and ligand efficacy. *Mol Pharmacol* 30:218–225.
- [43] Othman NA, Gallacher M, Deeb TZ, Baptista-Hon DT, Perry DC, Hales TG (2012)

- Influences on blockade by t-butylbicyclophosphorothionate of GABA(A) receptor spontaneous gating, agonist activation and desensitization. *J Physiol* 590:163–178.
- [44] Moor E, DeBoer P, Westerink BH (1998) GABA receptors and benzodiazepine binding sites modulate hippocampal acetylcholine release in vivo. *Eur J Pharmacol* 359:119–126.
- [45] Roland JJ, Savage LM (2009) Blocking GABA-A receptors in the medial septum enhances hippocampal acetylcholine release and behavior in a rat model of diencephalic amnesia. *Pharmacol Biochem Behav* 92:480–487.
- [46] Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- [47] Buhl EH, Halasy K, Somogyi P (1994) Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368: 823-828.
- [48] Schultz LM (1997) GABAergic inhibitory processes and hippocampal long-term potentiation. *Neuroscientist* 3:226-236.
- [49] Polc P, Robert N, Wright DM (1981) Ethyl β -Carboline-3-carboxylate antagonizes the action of GABA and benzodiazepines in the hippocampus. *Brain Res* 217:216-220.
- [50] Miller JA, Dudley MW, Kehne JH, Sorensen SM, Kane JM (1992) MDL 26,479: a potential cognition enhancer with benzodiazepine inverse agonist-like properties. *Br J Pharmacol* 107:78-86.
- [51] Everitt BJ, Robbins TW (1997) Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* 48:649–684.
- [52] Lehéricy S, Hirsch EC, Cervera-Piérot P, Hersch, LB, Bakchine S, Piette F, Duyckaerts C, Hauw JJ, Javoy-Agid F, Agid Y (1993) Heterogeneity and selectivity of the degeneration of cholinergic neurons in the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 330: 15–31.
- [53] Farlow MR, Hake A, Messina J, Hartman R, Veach J, Anand R (2001) Response of patients with Alzheimer's disease to rivastigmine treatment is predicted by the rate of disease progression. *Arch Neurol* 58:417–422.
- [54] Whitehead A, Perdomo C, Pratt RD, Birks J, Wilcock GK, Evans JG (2004). Donepezil for the symptomatic treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a meta-analysis of individual patient data from randomized controlled trials. *Int J Geriatr Psychiatry* 19:624-633.
- [55] Chen HS, Pellegrini JW, Aggarwal SK, Lei SZ, Warach S, Jensen FE, Lipton SA (1992) Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Neurosci* 12:4427–4436.
- [56] Chen HS, Wang YF, Rayudu PV, Edgecomb P, Neill JC, Segal MM, Lipton SA, Jensen FE

- (1998) Neuroprotective concentrations of the N-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation. *Neuroscience* 86:1121–1132.
- [57] Bashir ZI, Alford S, Davies SN, Randall AD, Collingridge GL (1991) Long-term potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 349:156–158.
- [58] Seabrook GR, Easter A, Dawson GR, Bowery BJ (1997) Modulation of long-term potentiation in CA1 region of mouse hippocampal brain slices by GABAA receptor benzodiazepine site ligands. *Neuropharmacology* 36:823–830.
- [59] Maurice T, Hiramatsu M, Itoh J, Kameyama T, Hasegawa T, Nabeshima T (1994a) Behavioral evidence for a modulating role of sigma ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. *Brain Res* 647:44–56.
- [60] Maurice T, Su TP, Parish DW, Nabeshima T, Privat A (1994b) PRE-084, a sigma selective PCP derivative, attenuates MK-801-induced impairment of learning in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 49:859–869.
- [61] Geddes JW, Chang-Chui H, Cooper SM, Lott IT, Cotman CW (1986) Density and distribution of NMDA receptors in the human hippocampus in Alzheimer's disease. *Brain Res* 399:156–161.
- [62] Kravitz E, Gaisler-Salomon I, Biegon A (2013) Hippocampal glutamate NMDA receptor loss tracks progression in Alzheimer's disease: quantitative autoradiography in postmortem human brain. *PLoS One* 8:e81244.
- [63] Paxinos G, Watson C (1982) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- [64] Yamada K, Noda Y, Hasegawa T, Komori Y, Nikai T, Sugihara H, Nabeshima T (1996). The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 276:460-466.
- [65] Yamada K, Tanaka T, Senzaki K, Kameyama T, Nabeshima T (1998) Propentofylline improves learning and memory deficits in rats induced by β -amyloid protein-(1-40). *Eur J Pharmacol* 349:15-22.
- [66] Tang, AH, Franklin, SR, Himes, CS and Ho PM (1991) Behavioral Effects of U-78875, a Quinoxalinone Anxiolytic with Potent Benzodiazepine Antagonist Activity. *J Pharmacol Exp Ther* 259: 248-254.
- [67] Wilson FJ, Leiser SC, Ivarsson M, Christensen SR, Bastlund JF (2014) Can pharmaco-electroencephalography help improve survival of central nervous system drugs in early clinical development? *Drug Discov Today* 19:282-8.

- [68] Engels MM, Hillebrand A, van der Flier WM, Stam CJ, Scheltens P, van Straaten EC (2016) Slowing of Hippocampal Activity Correlates with Cognitive Decline in Early Onset Alzheimer's Disease. An MEG Study with Virtual Electrodes. *Front Hum Neurosci* 10:238.
- [69] Kappos L, Li DK, Stüve O, Hartung HP, Freedman MS, Hemmer B, Rieckmann P, Montalban X, Ziemssen T, Hunter B, Arnould S, Wallström E, Selmaj K (2016) Safety and Efficacy of Siponimod (BAF312) in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Dose-Blinded, Randomized Extension of the Phase 2 BOLD Study. *JAMA Neurol* Jul 5.
- [70] Johnson DE, Drummond E, Grimwood S, Sawant-Basak A, Miller E, Tseng E, McDowell LL, Vanase-Frawley MA, Fisher KE, Rubitski DM, Stutzman-Engwall KJ, Nelson RT, Horner WE, Gorczyca RR, Hajos M, Siok CJ (2012) The 5-hydroxytryptamine₄ receptor agonists prucalopride and PRX-03140 increase acetylcholine and histamine levels in the rat prefrontal cortex and the power of stimulated hippocampal θ oscillations. *J Pharmacol Exp Ther* 341:681-91.
- [71] Herrik KF, Mørk A, Richard N, Bundgaard C, Bastlund JF, de Jong IE (2016) The 5-HT₆ receptor antagonist idalopirdine potentiates the effects of acetylcholinesterase inhibition on neuronal network oscillations and extracellular acetylcholine levels in the rat dorsal hippocampus. *Neuropharmacology* 107:351-63.
- [72] Stoiljkovic M, Leventhal L, Chen A, Chen T, Driscoll R, Flood D, Hodgdon H, Hurst R, Nagy D, Piser T, Tang C, Townsend M, Tu Z, Bertrand D, Koenig G, Hajós M (2015) Concentration-response relationship of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist FRM-17874 across multiple in vitro and in vivo assays. *Biochem Pharmacol* 97:576-89.
- [73] Kosasa T, Kuriya Y, Yamanishi Y (1999) Effect of donepezil hydrochloride (E2020) on extracellular acetylcholine concentration in the cerebral cortex of rats. *Jpn J Pharmacol* 81:216-22.
- [74] Mohler EG, Shacham S, Noiman S, Lezoualc'h F, Robert S, Gastineau M, Rutkowski J, Marantz Y, Dumuis A, Bockaert J, Gold PE, Ragozzino ME (2007) VRX-03011, a novel 5-HT₄ agonist, enhances memory and hippocampal acetylcholine efflux. *Neuropharmacology* 53:563-73.
- [75] Macdonald IR, Rockwood K, Martin E, Darvesh S (2014) Cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease: is specificity the answer? *J Alzheimers Dis* 42:379–384.
- [76] Mota SI, Ferreira IL, Rego AC (2014) Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease-a focus on NMDA receptors. *Neuropharmacology* 76:16–26.
- [77] Schliebs R, Arendt T (2006) The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 113:1625–1644.
- [78] Hardy J, Cowburn R, Barton A, Reynolds G, Lofdahl E, O'Carroll AM (1987) Region-specific loss of glutamate innervation in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 73:77–80.

- [79] Lin CH, Huang YJ, Lin CJ, Lane HY, Tsai GE (2014) NMDA neurotransmission dysfunction in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 20:5169–5179.
- [80] Nguyen MD, Salbu RL (2013) Donepezil 23 mg: a brief insight on efficacy and safety concerns. *Consult Pharm* 28:800-803.
- [81] Vandresen-Filho S, França LM, Alcantara-Junior J, Nogueira LC, de Brito TM, Lopes L, Junior FM, Vanzeler ML, Bertoldo DB, Dias PG, Colla AR, Hoeller A, Duzzioni M, Rodrigues AL, de Lima TC, Tasca CI, Viola GG (2015) Statins enhance cognitive performance in object location test in albino Swiss mice: involvement of beta-adrenoceptors. *Physiol Behav* 143:27–34.
- [82] Assini FL, Duzzioni M, Takahashi RN (2009) Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behav Brain Res* 204:206–211.
- [83] Michels G, Moss SJ (2007) GABAA receptors: properties and trafficking. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42:3-14.
- [84] Murata T, Matsumura K, Sihver S, Onoe H, Bergström M, Sihver W, Yonekura Y, Långström B, Watanabe Y (1998) Triazolam-induced modulation of muscarinic acetylcholine receptor in living brain slices as revealed by a new positron-based imaging technique. *J Neural Transm* 105:1117-1127.
- [85] Prenosil GA, Schneider Gasser EM, Rudolph U, Keist R, Fritschy JM, Vogt KE (2006) Specific subtypes of GABAA receptors mediate phasic and tonic forms of inhibition in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 96:846-857.
- [86] May AC, Fleischer W, Kletke O, Haas HL, Sergeeva OA (2013) Benzodiazepine-site pharmacology on GABAA receptors in histaminergic neurons. *Br J Pharmacol* 170:222-232.
- [87] El-Bakri NK, Islam A, Zhu S, Elhassan A, Mohammed A, Winblad B, Adem A (2004) Effects of estrogen and progesterone treatment on rat hippocampal NMDA receptors: relationship to Morris water maze performance. *J Cell Mol Med* 8:537-544.
- [88] Levin ED, Bettgowda C, Weaver T, Christopher NC (1998) Nicotine-dizocilpine interactions and working and reference memory performance of rats in the radial-arm maze. *Pharmacol Biochem Behav* 61:335-340.
- [89] Horowski R, Dorrow R (2002) Anxiogenic, not psychotogenic, properties of the partial inverse benzodiazepine receptor agonist FG 7142 in man. *Psychopharmacology (Berl)* 162:223–224.
- [90] Contó MB, de Carvalho JG, Benedito MA (2005) Behavioral differences between subgroups of rats with high and low threshold to clonic convulsions induced by DMCM, a benzodiazepine inverse agonist. *Pharmacol Biochem Behav* 82:417–426.

- [91] Appleyard ME, Taylor SC, Little HJ (1990) Acetylcholinesterase activity in regions of mouse brain following acute and chronic treatment with a benzodiazepine inverse agonist. *Br J Pharmacol* 101: 500-604.
- [92] Maubach K (2003) GABA (A) receptor subtype selective cognition enhancers. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2:233–239.
- [93] Atack JR, Smith AJ, Emms F, McKernan RM (1999) Regional differences in the inhibition of mouse in vivo [3H]Ro 15-1788 binding reflect selectivity for $\alpha 1$ versus $\alpha 2$ and $\alpha 3$ subunit-containing GABAA receptors. *Neuropsychopharmacology* 20:255–262.
- [94] Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92:180–185.
- [95] Schweri M, Cain M, Cook J, Paul S, Skolnick P (1982) Blockade of 3-carbomethoxy-beta-carboline induced seizures by diazepam and the benzodiazepine antagonists, Ro15-1788 and CGS 8216. *Pharmacol Biochem Behav* 17:457–460.
- [96] Dorow R, Horowski R, Paschelke G, Amin M (1983) Severe anxiety induced by FG 7142, a beta-carboline ligand for benzodiazepine receptors. *Lancet* 2:98–99.
- [97] Dorow R (1987) FG 7142 and its anxiety-inducing effects in humans. *Br J Clin Pharmacol* 23:781-782.
- [98] Ahnaou A, Huysmans H, Jacobs T, Drinkenburg WH (2014) *Neuropharmacology* 86:362-377.
- [99] Yousefi B, Nasehi M, Khakpai F, Zarrindast MR (2012) Possible interaction of cholinergic and GABAergic systems between MS and CA1 upon memory acquisition in rats. *Behav Brain Res* 235:231–243.