S-8

細胞内情報伝達よりみた向知性薬ネフィラセタムの Ca^{2+} チャンネルとニコチン性 ACh 受容体に対する賦活作用吉井 光信¹⁾, 西崎 知之²⁾, 渡部 繁男^{1,3)}¹⁾東京都精神医学総合研究所神経生理研究部門, ²⁾神戸大学医学部生理学第一講座, ³⁾第一製薬(株)創薬第三研究所

人口の高齢化に伴い老年期痴呆患者が増加し、痴呆患者に対する優れた薬剤の開発が急務となってきた。このような状況のもとに、新しいタイプの脳機能改善薬として向知性薬 (nootropics) が注目されている。向知性薬とは、心臓・血管系や他の臓器には作用せず、安全性が高く、学習・記憶などを司る脳の部位 (終脳) に選択的に作用し、その欠損を回復させる特殊な効果をもつ薬物である、と定義されている¹⁾。その中心をなすのは環状GABA (pyrrolidone) 誘導体であり、その原型はピラセタムである。

向知性薬は既知の受容体には臨床濃度では作用せず、その作用部位は不明である。しかし、向知性薬により脳内における種々の興奮性および抑制性シナプス伝達が促進するとの知見が多い²⁾。これに関連して各種イオンチャンネル、特に伝達物質の放出に関与する Ca^{2+} チャンネルに対する作用が調べられてきたが、有力な証拠は得られていなかった。

我々は、培養神経細胞 (NG108-15) の N/L 型 Ca^{2+} チャンネルが向知性薬ネフィラセタムにより賦活されることを見つけ、この作用発現に百日咳毒素 (PTX) 感受性の抑制性G蛋白質およびcAMP依存性蛋白キナーゼA (PKA) が関与することを示唆した³⁾ (Fig. 1 および Fig. 2)。

Fig. 1. Saturation of facilitatory actions of nefiracetam and dibutyryl cyclic AMP on N/L-type Ba^{2+} currents recorded from NG108-15 cells. A, currents enhanced by 1 μM nefiracetam were examined by 1 mM dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP) added to nefiracetam. B, currents enhanced by 1 mM db-cAMP were examined by 1 μM nefiracetam added to db-cAMP. C, currents partially enhanced by 0.1 μM nefiracetam were increased by 1 mM db-cAMP (no nefiracetam), and then, examined by 1 μM nefiracetam added to the db-cAMP. Reproduced with permission from Ref. 3.

Fig. 2. Disappearance of nefiracetam actions on N/L-type Ba^{2+} currents in pertussis toxin (PTX)-treated cells. The current amplitudes were compared before and after application of 1 μM nefiracetam. Reproduced with permission from Ref. 3.

一方、ニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体も脳内における神経伝達物質放出に寄与することが最近提唱されている⁴⁾。我々はシビレエイ nACh 受容体 (native および mutant) を発現させた細胞から電流記録を行い、ネフィラセタムの作用に関与する細胞内情報伝達経路を同定した⁵⁾。

ネフィラセタムは用量に依存して一過性の抑制作用 (0.01 - 0.1 μM) と持続性の増強作用 (1 - 10 μM) という相反する二相性作用を示した。抑制作用は、PTX 感受性 G 蛋白質の制御による PKA の活性化と、その結果生じる受容体の磷酸化によることが分かった。他方、増強作用は Ca^{2+} 依存性蛋白キナーゼ C (PKC) の活性化と、それによる受容体の磷酸化に起因することが示された (Fig. 3)。

Fig. 3. Regulation of ACh-evoked currents by nefiracetam-mediated PKA and PKC activation. The illustrated currents were induced by 100 μM ACh 10 min before and 30 min after treatment with 0.01 μM (A) or 1 μM (B) nefiracetam. The holding potential was -30 mV. A, oocytes expressing the normal or mutant ACh receptors lacking PKA phosphorylation sites in the presence and absence of H-89 (1 μM). Some oocytes were treated with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PTX for 24 hr before experiments. In the other experiments, ACh was applied to a single oocyte expressing the normal ACh receptors before and after 15 min treatment with forskolin (20 μM). B, oocytes expressing the normal or mutant ACh receptors lacking PKC phosphorylation sites in the presence and absence of 100 nM GF109203X, 5 μM staurosporine, or in Ca^{2+} -free extracellular solution.

実際にモルモットやラットの海馬切片にネフィラセタム (1 μM) を10分間投与したところ、神経伝達 (フィールドEPSPを指標) が4時間以上にわたり増強した。このような長期増強 (LTP) 様の作用は、 α -bungarotoxinなどのnACh受容体阻害剤やGF109203XなどのPKC阻害剤によりブロックされた。従って、上記の結果と併せて考えると、脳のnACh受容体が賦活化したことによるものと思われる。

以上の結果より、ネフィラセタムはPKAとPKCの活性化に作用することが明らかとなり、このような細胞内情報伝達経路により Ca^{2+} チャンネルやnACh受容体の機能を賦活し、神経伝達を促進するものと思われる。今後の課題として、向知性薬がどのようにしてPKAの活性化をもたらすのか、その際のPTX感受性G蛋白質の働きは何なのか、また、どのようなメカニズムでPKCを活性化するのか、という諸点を明らかにしなければならない。

文 献

- 1) Giurgea CE: The nootropic concept and its prospective implications. *Drug Dev. Res.* **2**, 441-446 (1982)
- 2) Gouliarov AH and Senning A: Piracetam and other structurally related nootropics. *Brain Res. Rev.* **19**, 180-222 (1994)
- 3) Yoshii M and Watabe S: Enhancement of neuronal calcium channel currents by the nootropic agent, nefiracetam (DM-9384), in NG108-15 cells. *Brain Res.* **642**, 123-131 (1994)
- 4) Wonnacott S: Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* **20**, 92-98 (1997)
- 5) Nishizaki T, Matsuoka T, Nomura T, Sumikawa K, Shiotani T, Watabe S and Yoshii M: Nefiracetam modulates acetylcholine receptor currents via two different signal transduction pathways. *Mol. Pharmacol.* **53**, 1-5 (1988)

Abstract- Facilitatory actions of the cognitive enhancer nefiracetam on neuronal Ca^{2+} channels and nicotinic ACh receptors: Their intracellular signal transduction pathways. Mitsunobu Yoshii¹, Tomoyuki Nishizaki² and Shigeo Watabe^{1,3}. ¹Department of Neurophysiology, Tokyo Institute of Psychiatry, 2-1-3 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8585, ²Department of Physiology, Kobe University School of Medicine, 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0017, and ³New Product Research Laboratories III, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., 1-16-13 Kita-kasai, Edogawa-ku, Tokyo 134-8630, Japan.

Folia Pharmacol. Jpn. (Nippon Yakurigaku Zasshi) **112**, Suppl 1, 41P~43P (1998)

Nootropics are proposed to serve as cognition enhancers. The underlying mechanism, however, is largely unknown. We have attempted to assess the intracellular signal transduction pathways mediating the action of nefiracetam, a nootropic agent, on neuronal Ca^{2+} channels and nicotinic ACh receptors. In NG108-15 cells, nefiracetam (1 μM) enhanced the activities of N/L-type Ca^{2+} channels without affecting T-type. The nefiracetam action was mimicked by dibutyryl cAMP (1 mM), or blocked by pertussis toxin (PTX), indicating that PTX-sensitive inhibitory G-proteins and cAMP-dependent pathways mediate the drug action. Nefiracetam also exerted a dose-dependent biphasic effect on *Torpedo* nicotinic acetylcholine (nACh) receptors expressed in *Xenopus* oocytes, in which the drug induced a short-term depression of ACh-evoked currents at submicromolar concentrations (0.01 - 0.1 μM) and a long-term enhancement of the currents at micromolar concentrations (1 - 10 μM). The depression was caused by activation of PTX-sensitive G-protein-regulated cAMP-dependent protein kinase (PKA) with subsequent phosphorylation of the ACh receptors; in contrast, the enhancement was caused by activation of Ca^{2+} -dependent protein kinase C (PKC) and the ensuing PKC phosphorylation of the receptors. It is concluded that nefiracetam interacts with PKA and PKC pathways, which may explain a cellular mechanism for the action of cognitive enhancers.

Key words: Nefiracetam, Cognitive enhancers, Inhibitory G-proteins, PKA, PKC