

シナス蛋白複合体形成－ 分離過程の神経伝達物質遊離機構を介した 抗てんかん作用発現機序の解析

Interaction Between Antiepileptic Drugs and SNAREs

岡田元宏¹⁾ 朱剛¹⁾ 吉田淑子^{1,2)}
金井数明¹⁾ 岩佐博人¹⁾ 兼子直¹⁾

要約：代表的抗てんかん薬(AED)である, carbamazepine (CBZ), valproate (VPA), zonisamide (ZNS)の神経伝達物質開口分泌機構に対する効果を明らかにするため, SNARE阻害薬botulinum toxin (BoNT)とAEDの海馬ドパミン・セロトニンの基礎・カルシウム刺激性・カリウム刺激性遊離に対する相互作用を検討した。海馬モノアミン基礎・カルシウム刺激性遊離はsyntaxin阻害薬BoNT/Cによって抑制されたが, カリウム刺激性遊離はsynaptobrevin阻害薬BoNT/Bによって抑制された。有効濃度のAEDは基礎・カルシウム刺激性モノアミン遊離を亢進したが, この増強作用はBoNT/Cによって抑制された。カリウム刺激性モノアミン遊離は濃度依存性にAEDによって抑制されたが, この抑制効果は, BoNT/Bにより抑制された。これらの結果はCBZ, VPA及びZNSは神経伝達物質開口分泌を構成する蛋白群に対して特異的標的蛋白を有する可能性を示唆する。また, 開口分泌機構に対し標的蛋白を有し, 興奮性神経伝達物質遊離を抑制し, 同時に抑制性神経伝達物質遊離を亢進する新たな抗てんかん薬開発の可能性をも示唆する。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2002;14:61-74

Key Words : carbamazepine, valproate, zonisamide, botulinum toxin, serotonin, dopamine, SNARE, exocytosis

緒言

Carbamazepine (CBZ), zonisamide (ZNS), valproate (VPA)は抗てんかん薬(AED)であると同時に(Scheffer et al., 1994; Bourgeois, 1995; Loiseau et al., 1995; Seino & Ito, 1997), 情動安定化薬としての有効性も広く認知されている(Okuma et al., 1990; Kanba et al., 1994; Norton & Ouarles, 2000)。CBZは部分てんかんの第一

選択薬であるが(Scheffer et al., 1994; Loiseau et al., 1995), VPAは全般てんかんの第一選択薬である(Bourgeois, 1995)。一方, ZNSは部分てんかん, 全般てんかんに対し, CBZ, VPAに匹敵する有効性が報告されている(Seino & Ito, 1997)。CBZ・ZNSの抗てんかん主要作用機序は, 電位依存性ナトリウムイオンチャネル (VGSC)の抑制と考えられている(McLean & Macdonald, 1986; Rock et al., 1989; Mattson,

¹⁾ 弘前大学医学部神経精神医学講座

²⁾ 柴田バイオテック神経科学研究所

Motohiro Okada¹⁾, Gang Zhu¹⁾, Shukuko Yoshida^{1,2)}, Kazuaki Kanai¹⁾, Hiroto Iwasa¹⁾, Sunao Kaneko¹⁾

¹⁾ Department of Neuropsychiatry, Hirosaki University, Hirosaki 036-8216, Japan

²⁾ Institute of Neuroscience and Molecularbiology, Shibata BIOTEC

TEL: +81 172 395066, FAX: +81 172 395067, E-mail: okadamot@cc.hirosaki-u.ac.jp

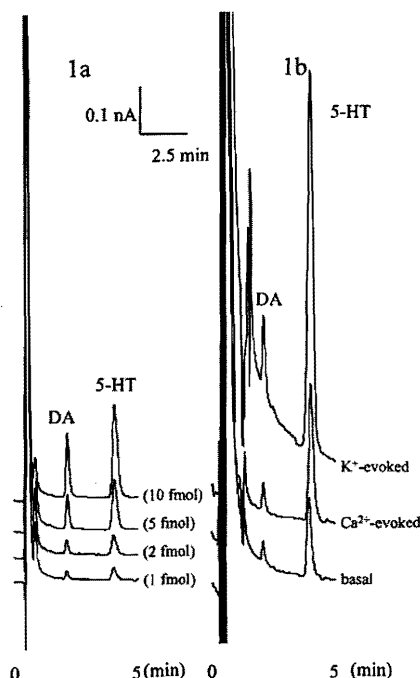


Fig. 1 Typical chromatograms of ECD-HPLC.

Fig. 1a and 1b represent the typical chromatograms obtained from 20 μ l of a standard solution containing DA and 5-HT, and hippocampal perfusate, respectively. In Fig. 1a, four lines express chromatograms of different concentrations of DA and 5HT (1, 2, 5 and 10 fmol). The quantification limits for DA and 5-HT were both 100 amol 20 μ l⁻¹. In Fig. 1b, three lines express chromatograms of basal, Ca²⁺- and K⁺-evoked releases.

1997)。VPAのVGSC活性に対する効果も検討されているが、VPAがsustained high-frequency repetitive firing (SRF)を抑制するが(Despland, 1994), CBZ・ZNSに類似したナトリウム電流抑制効果を有するの否かは未だ結論が出されていない(Bourgeois, 1995)。

モノアミンは多くの精神・神経疾患の病態に関与し、モノアミン系機能を介した治療が有効であることから、これら3剤のモノアミン系機能に対する効果が検討されてきた(Pratt et al., 1985; Elphick et al., 1990; Okada et al., 1992, 1995, 1997a, 1997b, 1997d, 1998a, 1998b, 1999a; Takebayashi et al., 1995; Okada

& Kanoko, 1998; Ichikawa & Meltzer, 1999; Kawata et al., 1999, 2001; Mizuno et al., 1994, 2000)。またVGSC機能抑制によって、古典的神経伝達物質の基礎遊離が劇的に減少することは既に証明されている(Westerink et al., 1988, 1989)。我々の過去の検討では、VGSC機能抑制効果を有するCBZ・ZNSはドパミン・セロトニン・アセチルコリン基礎遊離に対して濃度依存性二相性効果を有していた(Okada et al., 1992, 1995, 1997a, 1997d, 1998a, 1998b, 1999a; Mizuno et al., 1994; Kawata et al., 1999, 2001)。有効濃度範囲の両剤は、グルタミン酸基礎遊離に影響することなしにドパミン・セロトニン・アセチルコリン基礎遊離を亢進するにもかかわらず、脱分極誘発性遊離を抑制した(Okada et al., 1992, 1995, 1997a, 1997d, 1998a, 1998b, 1999a; Mizuno et al., 1994; Kawata et al., 1999, 2000)。逆に、過剰濃度のCBZ・ZNSは基礎・脱分極誘発性遊離を抑制した(Okada et al., 1992, 1995, 1997a, 1997d, 1998a, 1998b, 1999a; Kawata et al., 1999, 2001; Mizuno et al., 2000)。VPAは、CBZ・ZNSとは異なり濃度依存性二相性効果は証明されていない(Takebayashi et al., 1995)。

神経伝達物質遊離はsoluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptor (SNARE)を主体としたSNARE仮説によって解釈されている(Sollner et al., 1993; Sudhof 1995)。小胞体膜上に存在するvSNAREであるsynaptotagminとsynaptobrevinが、形質膜上に存在するtSNAREであるsyntaxinとSNAP-25に α -SNAP・NSF上でシナプス蛋白機能の複合体を形成或いは分離するが、この過程によって開口分泌が進行すると考えられている(Sollner et al., 1993; Sudhof 1995)。我々は海馬セロトニンが、N型電位依存性カルシウムイオンチャネル(N-VSCC)・C型蛋白リン酸化酵素(PKC)・syntaxinの機能的複合体(N-VSCC/PKC/syntaxin)とP型VSCC(P-VSCC)・A型蛋白リン酸化酵素(PKA)・synaptobrevinの機能的複合体(P-VSCC/PKA/synaptobrevin)によって制御されている実験事実を報告している(Okada et al., 2001)。

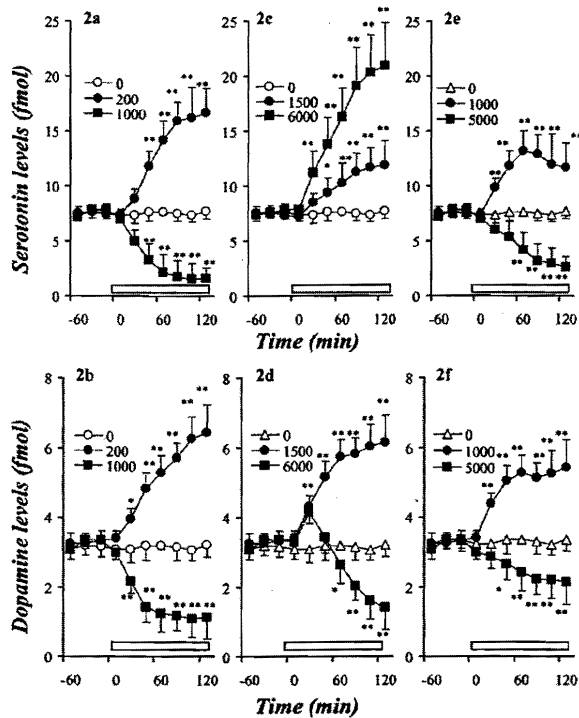


Fig. 2 Effects of AEDs on hippocampal basal releases of DA and 5-HT

The effects of CBZ, VPA and ZNS on the hippocampal basal 5-HT release are shown in Fig. 2a, 2c and 2e, respectively. The effects of CBZ, VPA and ZNS on the hippocampal basal DA release are shown in Fig. 2b, 2d and 2f, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD ($N=6$) of extracellular levels of 5-HT or DA (fmol sample⁻¹), and abscissas show the time in minutes (min). The open bars indicate perfusion with AEDs. The effects of CBZ, VPA and ZNS on hippocampal basal releases of DA and 5-HT were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison (*: $p<0.05$; **: $p<0.01$).

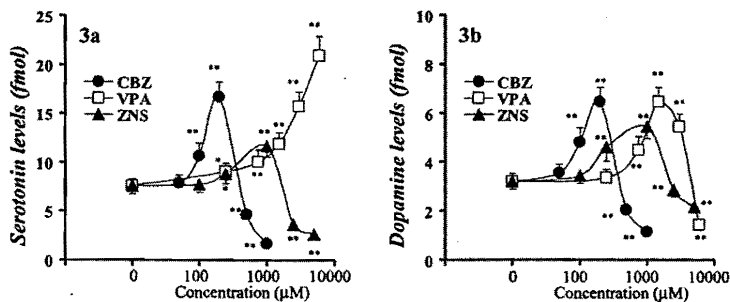


Fig. 3 Concentration-dependent effects of AEDs on basal releases of hippocampal DA and 5-HT

The concentration-dependent effects of CBZ, VPA and ZNS on basal releases of hippocampal 5-HT and DA are shown in Fig. 3a and 3b, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD ($N=6$) of levels of basal releases of DA and 5-HT (fmol sample⁻¹), and abscissas indicate the concentration of AEDs (μ M). The concentration-dependent effects of CBZ, VPA and ZNS on basal releases of hippocampal DA and 5-HT were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$).

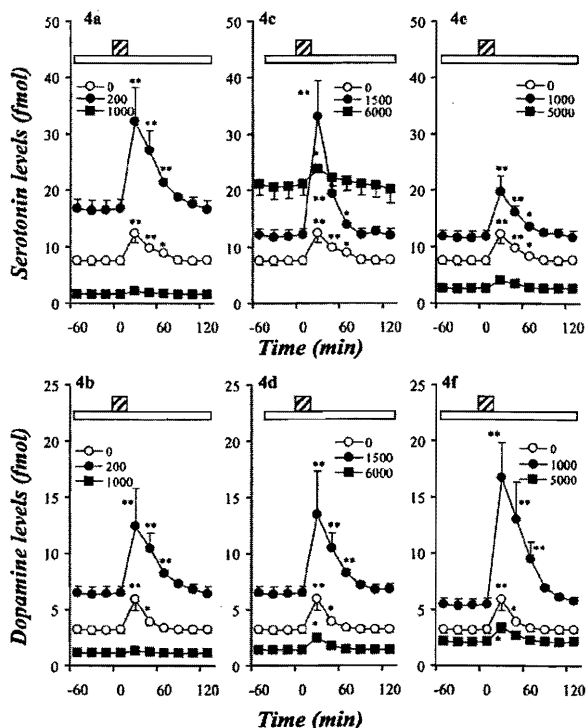


Fig. 4 Effects of AEDs on hippocampal Ca^{2+} -evoked releases of DA and 5-HT

The effects of CBZ, VPA and ZNS on the hippocampal Ca^{2+} -evoked 5-HT release are shown in Fig. 4a, 4c and 4e, respectively. The effects of CBZ, VPA and ZNS on the hippocampal Ca^{2+} -evoked DA release are shown in Fig. 4b, 4d and 4f, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD ($N=6$) of extracellular levels of 5-HT or DA (fmol sample^{-1}), and abscissas show the time in minutes (min). The open bars indicate perfusion with AEDs, and striped bars indicate the Ca^{2+} -evoked stimulation for 20 min. The effects of CBZ, VPA and ZNS on hippocampal Ca^{2+} -evoked releases of DA and 5-HT were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$).

以上の知見は、CBZ、VPA、ZNSが神経伝達物質開口分泌機構に対し特異的な標的蛋白を有する可能性を示唆するものであり、本報告では*in vivo* microdialysisを用い、CBZ、VPA、ZNSのSNARE蛋白機能に対する効果を検討した。

方 法

弘前大学動物実験施設で12時間の明暗サイクル(室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$)で1週間以上飼育した、体重250–300 gの雄性Wistar系ラット(Clea)を用い、弘前大学動物実験倫理委員会の承認を受け、弘前大学動物実験指針に基づき本実験を行った。

Microdialysis

イソフルレン吸入麻酔下で海馬(A = -5.8

mm, L = 4.8 mm, V = -4.0 mm relative to bregma) (Paxinos & Watson, 1986)にbotulinum toxin (BoNT)を溶解した $0.3 \mu\text{L}$ のmodified Ringer's solution(MRS)を微量注入した後に(Capogne et al., 1997; Pierce and Kolivas, 1997; Okada et al., 2001), 透析プローブ(0.22 mm diameter; 3 mm exposed membrane; Eicom: 京都)を挿入した(Okada et al., 1998a)。プローブ挿入18時間後に、流速 $1 \mu\text{L/min}$ で修正リンゲル液(MRS)[145 Na^+ , 2.7 K^+ , 1.2 Ca^{2+} , 1.0 Mg^{2+} , 154.4 Cl^- (in mM) 2 mM リン酸緩衝液と 1.1 mM Tris緩衝液でpH 7.40に調整]灌流を開始した(Okada et al., 1998b,c)。MRS内のカルシウム濃度を 1.2 mM から 3.4 mM に増加した透析液(HCMRS)あるいは、カリウム濃度を 2.7 mM から 50 mM に増加

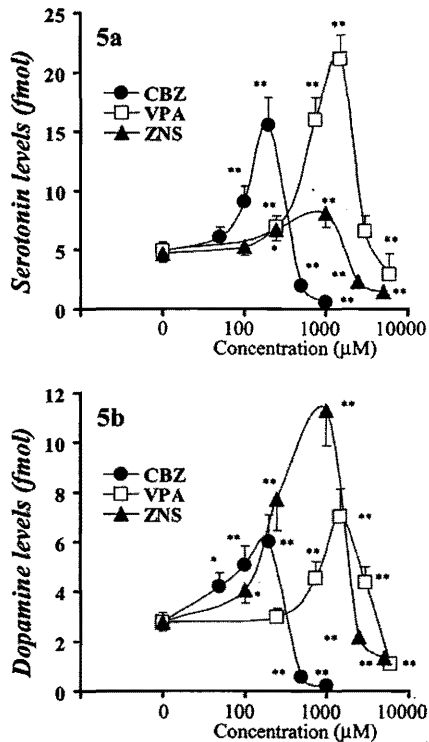


Fig. 5 Concentration-dependent effects of AEDs on Ca^{2+} -evoked releases of hippocampal DA and 5-HT

The concentration-dependent effects of CBZ, VPA and ZNS on Ca^{2+} -evoked releases of hippocampal 5-HT and DA are shown in Fig. 5a and 5b, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD ($N=6$) of levels of Ca^{2+} -evoked releases of DA and 5-HT (fmol sample $^{-1}$), and the abscissas indicate the AEDs concentration (μM). The concentration-dependent effects of CBZ, VPA and ZNS on Ca^{2+} -evoked releases of hippocampal DA and 5-HT were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$).

した透析液(HKMRS)を20分間灌流した(Okada et al., 1998c, 2001). 20分間隔でMRSを回収し, ECD-HPLCを用いてMRS内の5-HT濃度を測定した。

ECD-HPLC

5-HT濃度測定には, ボンフ (ECD-300, Eicom), graphite carbon電極を装着した電気化学検出

器(EP-30, Eicom)を用いた。分析カラムは, 関東化学から提供された mightysil RP-18 (particle size 5 μm)を, Masis(弘前)で化学処理後に600 kg/cm^2 以上の高圧充填したカラム(100 mm x 1.5 mm internal diameter)を用いた。移動層の組成は, 20%メタノール, 900 mg/L オクタスルホン酸ナトリウム, 50 mg/L EDTAを含有した0.1 Mリン酸緩衝液(pH 5.9)とし, 25 $^{\circ}\text{C}$, 流速200 $\mu\text{L}/\text{min}$, 過電圧450 mVに設定した(Okada et al., 2001)。

薬物投与

各種薬剤の投与方法は, BoNTは分子量10,000以上であり透析膜通過率が著しく低いため, プローブ挿入前に0.3 ng BoNTs含有したMRS 0.3 μL を微量注入した(Okada et al., 2001)。MRS灌流開始6時間後, 灌流MRS内のドパミン・セロトニン濃度測定を開始し, 60分間のCV値5%以下を安定化と定義した(Okada et al., 1998c)。安定化確認後, controlとしてドパミン・セロトニン基礎遊離測定を60分間行った後に, 各種薬剤を溶解したMRSに切り替え, 更に測定値の安定化確認後, HCMRS灌流(Ca^{2+} 刺激)或いはHKMRS灌流(K^{+} 刺激)を20分間施行した(Okada et al., 1998a, 1998b)。

統計解析

CBZ, VPA, ZNSのドパミン・セロトニン遊離に対する濃度依存性効果の解析には, 二元配置の分散分析(ANOVA)及びTukeyの多重比較を用いた。抗てんかん薬とBoNTsのドパミン・セロトニン遊離に対する相互作用の検討には, one-way ANOVA及びTukeyの多重比較を用い解析した。

結 果

ラット海馬灌流MRS内のドパミン及びセロトニンの含有量は, それぞれ 3.1 ± 0.3 fmol/20 μl , 7.5 ± 0.6 fmol/20 μl (mean \pm SD, $n=36$)であった。基礎実験では, Na^{+} チャネル阻害薬1 μM tetrodotoxin (TTX)含有MRS, Ca^{2+} -free MRS灌流によりMRS内ドパミン・セロトニン含有量は, それぞれ0.2 fmol/20 μl ・0.5 fmol/20 μl 以下に減少し, 20分間カリウム刺激では3.1から21.3 fmol/20 μl (カリウム刺激性遊離: $18.2 \pm$

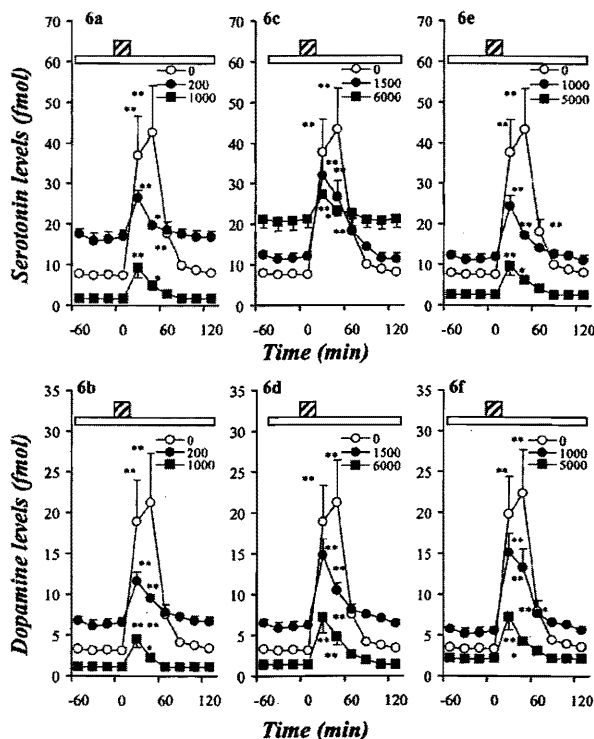


Fig. 6 Effects of AEDs on hippocampal K^+ -evoked releases of DA and 5-HT

The effects of CBZ, VPA and ZNS on hippocampal K^+ -evoked 5-HT release are shown in Fig. 6a, 6c and 6e, respectively. The effects of CBZ, VPA and ZNS on the hippocampal K^+ -evoked DA release are shown in Fig. 6b, 6d and 6f, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD ($N=6$) of extracellular levels of 5-HT or DA (fmol sample^{-1}), and abscissas show the time in minutes (min). The open bars indicate perfusion with AEDs, and striped bars indicate the K^+ -evoked stimulation for 20 min. The concentration-dependent effects of CBZ, VPA and ZNS on hippocampal K^+ -evoked releases of DA and 5-HT were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$).

2.6 $\text{fmol}/20 \mu\text{l}$, mean \pm SD, $n=36$), 7.5から42.5 $\text{fmol}/20 \mu\text{l}$ (カリウム刺激性遊離: $35.0 \pm 5.6 \text{ fmol}/20 \mu\text{l}$, mean \pm SD, $n=36$)へ増加し(Fig. 1,6,7), 本実験で測定したMRS内のモノアミン含有量は神経活動由来の基礎遊離基準を満たしていた(Westerink et al., 1989)。また, 20分間カルシウム刺激によってドパミンは3.1から6.0 $\text{fmol}/20 \mu\text{l}$ (カルシウム刺激性遊離: $2.9 \pm 0.3 \text{ fmol}/20 \mu\text{l}$)へ, セロトニンは7.5から12.4 $\text{fmol}/20 \mu\text{l}$ (カルシウム刺激性遊離: $4.9 \pm 0.6 \text{ fmol}/20 \mu\text{l}$)へ増加した(Fig. 1,4,5)。5-HT基礎遊離と K^+ 刺激性遊離の定量はKawata et al. (2001)の方法に従った。

海馬モノアミン基礎遊離に対する濃度依

存性効果

100-200 μM CBZ (海馬組織内濃度: 19-38 μM), 250-1000 μM ZNS (海馬組織内濃度: 53-210 μM)還流投与はドパミン・セロトニン基礎遊離を濃度依存性に増加した($P<0.01$)が, 500-1000 μM CBZ (海馬組織内濃度: 95-190 μM), 2500-5000 μM ZNS (海馬組織内濃度: 530-1050 μM)還流投与はドパミン・セロトニン基礎遊離を抑制した($P<0.01$) (Fig. 2,3)。

250-6000 μM VPA還流投与(海馬組織内濃度: 58-1380 μM)はセロトニン基礎遊離を濃度依存性に増加し, ドパミン基礎遊離は250-1500 μM 範囲内では増加したが, 3000 μM 以上の場合では減少した(Fig. 2,3)。

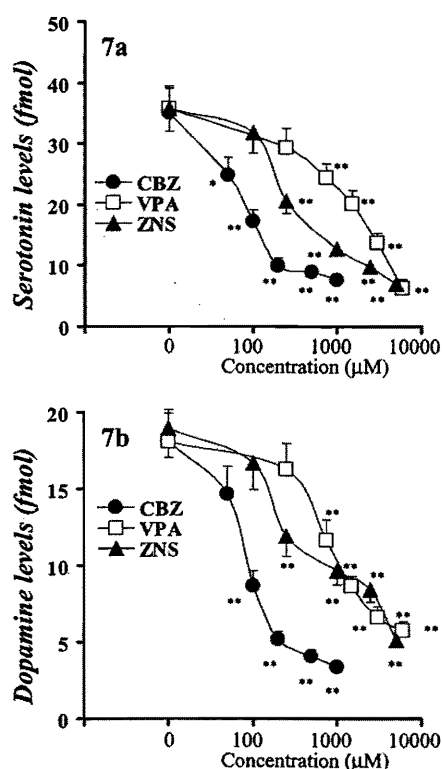


Fig. 7 Concentration-dependent effects of AEDs on K^+ -evoked releases of hippocampal DA and 5-HT

The concentration-dependent effects of CBZ, VPA and ZNS on K^+ -evoked releases of hippocampal 5-HT and DA are shown in Fig. 7a and 7b, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD ($N=6$) of levels of K^+ -evoked releases of DA and 5-HT (fmol sample $^{-1}$), and the abscissas indicate the concentration of AEDs (μ M). The concentration-dependent effects of CBZ, VPA and ZNS on hippocampal K^+ -evoked releases of DA and 5-HT were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$).

海馬カルシウム刺激性モノアミン遊離に対する濃度依存性効果

CBZ (100–200 μ M), ZNS (250–1000 μ M), VPA (250–1500 μ M) 還流投与はカルシウム刺激性ドパミン・セロトニン遊離は濃度依存性に増加した($P<0.01$). CBZ (500–1000 μ M), ZNS (2500–5000 μ M), VPA (3000–6000 μ M) では濃

度依存性に減少した($P<0.01$) (Fig. 4,5).

海馬カリウム刺激性モノアミン遊離に対する濃度依存性効果

CBZ, ZNS, VPAは検討した全ての濃度域で濃度依存性にカリウム刺激性ドパミン・セロトニン遊離を抑制した($P<0.01$) (Fig. 6,7).

SNARE抑制環境下におけるモノアミン基礎遊離に対する効果

マイクロインジェクションによるBoNT/B及びBoNT/C投与によりセロトニン基礎遊離は減少($P<0.01$)し、ドパミンも減少した(BoNT/B: $P<0.05$; BoNT/C: $P<0.01$) (Fig. 8). この基礎遊離に対する抑制効果は、BoNT/CがBoNT/Bよりも優位であった($P<0.05$) (Fig. 8).

BoNT/Bによるsynaptobrevin抑制環境下では、CBZ (200 μ M)及びZNS (1000 μ M)のモノアミン基礎遊離増強作用、CBZ (1000 μ M)及びZNS (5000 μ M)の抑制作用は認められた(Fig. 8). 同様に、VPAのセロトニン増加作用とドパミンに対する濃度依存性二相性効果もBoNT/Bによる影響は受けなかった(Fig. 8).

BoNT/Cによるsyntaxin抑制環境下では、CBZ (200 μ M)のモノアミン基礎遊離増強作用は抑制された($P<0.01$). 一方、CBZ (1000 μ M)の基礎遊離抑制作用は、syntaxin抑制環境下においても認められた(Fig. 8). Syntaxin抑制環境下においても、VPAのセロトニン増加作用は認められたが、この増加作用は抑制されていた。ドパミンに対するVPAの濃度依存性二相性効果はBoNT/C前処置においても認められた(Fig. 8). ZNS (1000 μ M)のセロトニン遊離増強作用はBoNT/C前処置により消失したが、ドパミン増強作用は認められた($P<0.01$) (Fig. 8). 逆にZNS (5000 μ M)では、BoNT/C前処置によって、セロトニンは減少($P<0.01$)し、ドパミンは変化がなかった (Fig. 8).

SNARE抑制環境下におけるカルシウム刺激性モノアミン基礎遊離に対する効果

BoNT/Bはカルシウム刺激性セロトニン・ドパミン遊離に効果はなかったが、BoNT/Cはカルシウム刺激性セロトニン・ドパミン遊離を抑制した($P<0.01$) (Fig. 9).

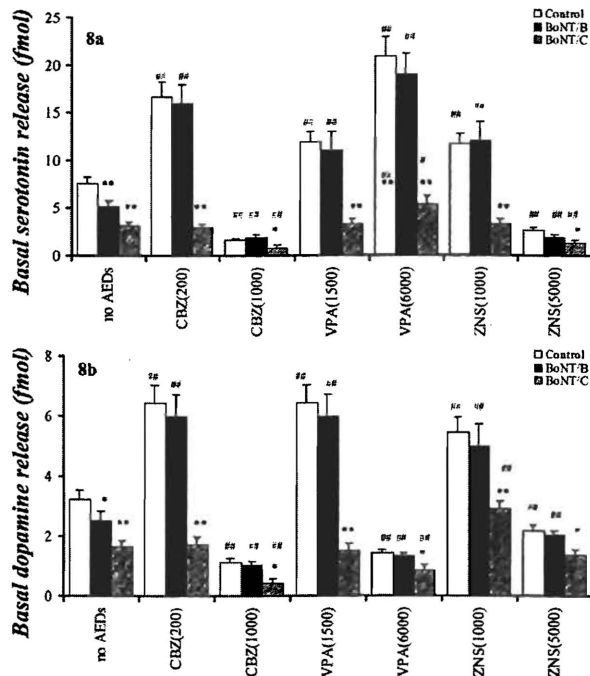


Fig. 8 Interaction between AEDs and BoNTs on hippocampal basal releases of DA and 5-HT
The interactions between AEDs and BoNTs on hippocampal basal release of 5-HT and DA are shown in Fig. 8a and 8b, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD (N=6) of levels of basal releases of DA and 5-HT (fmol sample⁻¹). The interaction between AEDs and BoNTs on hippocampal basal releases of DA and 5-HT were compared using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison (control Vs *: P<0.05; **: P<0.01, no AEDs Vs #: P<0.05; ##: P<0.01).

BoNT/B前処置環境下では、CBZ (200 μ M), VPA (1500 μ M), ZNS (1000 μ M)はカルシウム刺激性ドーパミン・セロトニン遊離を増加したが(P<0.01), CBZ (1000 μ M), VPA (6000 μ M), ZNS (5000 μ M)は抑制した(P<0.01) (Fig. 9)。BoNT/C前処置環境下では、CBZ (200 μ M), VPA (1500 μ M), ZNS (1000 μ M)の遊離増加作用, CBZ (1000 μ M), VPA (6000 μ M), ZNS (5000 μ M)の遊離抑制作用はともに抑制された(P<0.01) (Fig. 9)。

SNARE抑制環境下におけるカリウム刺激性モノアミン基礎遊離に対する効果

BoNT/B及びBoNT/Cはカリウム刺激性セロトニン・ドーパミン遊離を抑制したが、BoNT/B抑制効果はBoNT/Cの抑制効果よりも優位であった(P<0.01) (Fig. 10)。

BoNT/CはCBZ, VPA, ZNSの濃度依存性カ

リウム刺激性モノアミン遊離抑制効果に影響しなかった (Fig. 10)。BoNT/B前処置環境下では、CBZ (200 μ M), VPA (1500 μ M), ZNS (1000 μ M)の抑制効果を消失した(P<0.01)。しかし、CBZ (1000 μ M), VPA (6000 μ M), ZNS (5000 μ M)はカリウム刺激性遊離を抑制したものの、その抑制効果は減弱していた(P<0.05) (Fig. 10)。

考 察

海馬ドーパミン・セロトニン開口分泌機構

静止状態における開口分泌機構と脱分極誘発性開口分泌ではその発現機序が異なる可能性が示唆されている(Yoshihara et al., 1999; Kawata et al., 2001; Okada et al., 2001)。脱分極誘発性開口分泌機構は、神経終末に到達した活動電位がVSCCの開口を誘発し、神経終

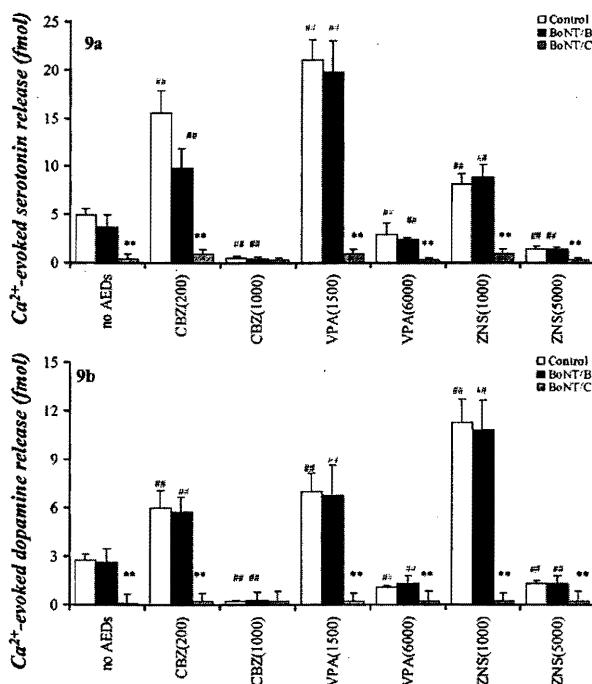


Fig. 9 Interaction between AEDs and BoNTs on hippocampal Ca^{2+} -evoked releases of DA and 5-HT
The interactions between AEDs and BoNTs on hippocampal Ca^{2+} -evoked release of 5-HT and DA are shown in Fig. 9a and 9b, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD (N=6) of levels of Ca^{2+} -evoked releases of DA and 5-HT (fmol sample⁻¹). The interaction between AEDs and BoNTs on hippocampal Ca^{2+} -evoked releases of DA and 5-HT were compared using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison (control Vs *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, no AEDs Vs #: $P < 0.05$; ##: $P < 0.01$).

末活性体へのカルシウム流入が生じる (Roberts et al., 1990)。一方、静止状態のシナプス小胞の形質膜との融合はminiature synaptic potentialsによって制御されていると考えられ、これにより活性体内のカルシウム濃度はミリモラー単位までにまで上昇すると考えられている (Delaney & Tank, 1994; Xu et al., 1998)。既に、我々は海馬セロトニン開口分泌がN-type VSCC/PKC/syntaxinとP-type VSCC/PKA/synaptobrevinの二種類の機能的蛋白複合体によって制御されていることを報告している (Kawata et al., 2001; Okada et al., 2001)。本実験結果は、海馬ドパミンも、海馬セロトニン同様に、機能的蛋白複合体によって制御されている可能性を示唆している。

CBZ及びZNSのモノアミン遊離に対する効果

有効濃度のCBZ, ZNSはVGSC活性を抑制す

るが (McLean & MacDonald, 1986; Mattson, 1997), VGSC機能抑制はモノアミン遊離を抑制することも知られている (Westerink et al., 1988, 1989; Kawata et al., 2001)。しかし, VGSC機能を抑制するCBZ (17–42 μM), ZNS (47–330 μM) が、海馬における基礎・カルシウム刺激性遊離を亢進するが、脱分極誘発性ドパミン・セロトニン遊離を抑制した (Okada et al., 1992; Kawata et al., 1999, 2001)。逆に過剰濃度CBZ, ZNSは基礎・カルシウム刺激性・カリウム刺激性遊離の全てを抑制した (Okada et al., 1992, 1995, 1997a, 1997d, 1998a, 1998b; Kawata et al., 1999, 2001)。この相違はCBZ, ZNSの, N-type VSCC/PKC/syntaxinとP-type VSCC/PKA/synaptobrevinに対する感受性の違いから由来する可能性を示す。

N-type VSCC/PKC/syntaxin複合体によって選択的に制御されているカルシウム刺激性モ

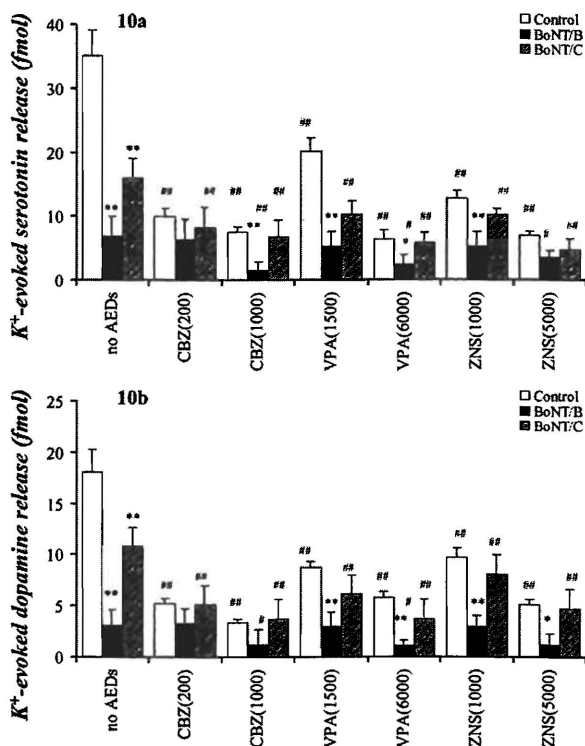


Fig. 10 Interaction between AEDs and BoNTs on hippocampal K⁺-evoked releases of DA and 5-HT

The interactions between AEDs and BoNTs on hippocampal K⁺-evoked release of 5-HT and DA are shown in Fig. 10a and 10b, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD (N=6) of levels of K⁺-evoked releases of DA and 5-HT (fmol sample⁻¹). The interaction between AEDs and BoNTs on hippocampal K⁺-evoked releases of DA and 5-HT were compared using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison (control Vs *: P<0.05; **: P<0.01, no AEDs Vs #: P<0.05; ##: P<0.01).

ノアミン遊離を、有効濃度のCBZ, ZNSは増加させる。この増加作用をBoNT/Cは抑制するが、BoNT/Bは効果がないことから、有効濃度のCBZ, ZNSは少なくともsyntaxin機能を増強する可能性が示唆される。逆に、P-type VSCC/PKA/synaptobrevin複合体によって制御されているカリウム刺激性遊離は、有効濃度から過剰濃度の範囲のCBZ, ZNSにより濃度依存性に抑制されるが、この抑制作用はBoNT/Bによって抑制されることから、CBZ, ZNSはsynaptobrevin機能を濃度依存性に抑制する可能性が示唆される。

VPAのモノアミン遊離に対する効果

VPAはCBZ, ZNS同様にドパミン基礎遊離に対して濃度依存性二相性効果を有していたが、セロトニン基礎遊離に対しては有効濃度

から過剰濃度にかけて濃度依存性に増強を示した。一方、カルシウム刺激性遊離に対しては、ドパミン・セロトニンともに濃度依存性二相性効果を有していた。有効濃度のVPAの基礎・カルシウム刺激性遊離増強作用はBoNT/Cによって抑制され、BoNT/Bは効果がなかったことから、少なくとも有効濃度のVPAはCBZ, ZNS同様にsyntaxin機能を増強する可能性が示唆される。

カリウム刺激性遊離に対しては、有効濃度から過剰濃度の濃度範囲において、濃度依存性にVPAは抑制し、この抑制効果はBoNT/Bによって抑制されたことから、VPAはCBZ, ZNS同様にsynaptobrevin機能を抑制する可能性がある。

CBZ, VPA, ZNSの新たな標的蛋白の可

能性

古典的抗てんかん薬の代表である, CBZ及びVPA, そしてこの両剤の特徴を兼ね備えたZNSが, 有効濃度ではsyntaxin関連性神経伝達物質開口分泌を亢進し, 逆にsynaptobrevin関連性開口分泌を抑制することは, 抗てんかん薬の共通した標的蛋白として, 開口分泌機構に関与するシナプス蛋白が重要な役割を果たしている可能性が示唆される。しかし, 従来の基礎てんかん学的研究によって蓄積された興奮性神経伝達物質であるglutamateと抑制性神経伝達物質であるGABAの開口分泌機構がセロトニン・ドパミンと同様の機構によって制御されているか否かも明らかにされておらず, 今後, 各種神経伝達物質の開口分泌機構を明らかにし, 各種抗てんかん薬の作用を詳細に検討する必要がある。

文 献

- 1) BOURGEOIS, B.F.D. (1995). Valproic acid Clinical Use. In *Antiepileptic drugs, Fourth edition*: ed. Levy, R.H., Mattson, R.H. & Meldrum, B.S. pp. 633-639. New York: Raven Press.
- 2) CAPOGNA, M. MCKINNEY, R.A. O'CONNOR, V. GAHWILER, B.H. & THOMPSON, S.M. (1997). Ca^{2+} or Sr^{2+} partially rescues synaptic transmission in hippocampal cultures treated with botulinum toxin A and C, but not tetanus toxin. *J. Neurosci.*, **17**, 7190-7202.
- 3) DELANEY, K.R. & TANK, D.W. (1994). A quantitative measurement of the dependence of short-term synaptic enhancement on synaptic residual calcium. *J. Neurosci.*, **14**, 5885-5902.
- 4) DESPLAND, P.A. (1994) A retrospective study of 113 epileptic patients treated with sustained-release valproate. *Epilepsia*, **35**, Suppl 5:S99-100.
- 5) DURING, M.J. RYDER, K.M. & SPENCER, D.D. (1995). Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature*, **376**, 174-177.
- 6) ELPHICK, M. ANDERSON, S.M., HALLIS, K.F. & GRAHAME-SMITH, D.G. (1990). Effects of carbamazepine on 5-hydroxytryptamine function in rodents. *Psychopharmacology*, **100**, 49-53.
- 7) HIROSE, S. OKADA, M. KANEKO, S. & MITUDOME, A. (2000). Are some idiopathic epilepsies disorders of the ion channels?: A working hypothesis. *Epilepsy Res.*, **41**, 191-204.
- 8) ICHIKAWA, J. & MELTZER, H.Y. (1999). Valproate and carbamazepine increase prefrontal dopamine release by 5-HT_{1A} receptor activation. *Eur. J. Pharmacol.*, **380**, R1-3.
- 9) JUERGENS, U. (1987). Simultaneous determination of zonisamide and nine other anti-epileptic drugs and metabolites in serum. *J. Chromatogr.*, **385**, 233-240.
- 10) KANBA, S. YAGI, G. KAMIJIMA, K. SUZUKI, T. TAJIMA, O. OTAKI, J. ARATA, E. KOSHIKAWA, H. NIBUYA, M. KINOSHITA, N. & ASAI, M. (1994). The first open study of zonisamide, a novel anticonvulsant, shows efficacy in mania. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.*, **18**, 707-715.
- 11) KATO, T. OTSU, Y. FURUNE, Y. & YAMAMOTO, T. (1992). Different effects of L-, N- and T-type calcium channel blockers on striatal dopamine release measured by microdialysis in freely moving rats. *Neurochem. Int.*, **21**, 99-107.
- 12) KAWATA, Y. OKADA, M. MURAKAMI, T. KAMATA, A. ZHU, G. & KANEKO, S. (2001). Pharmacological discrimination between effects of carbamazepine on hippocampal basal, Ca^{2+} - and K^{+} -evoked serotonin releases. *Br. J. Pharmacol.*, **133**, 557-567.
- 13) KAWATA, Y. OKADA, M. MURAKAMI, T. MIZUNO, K. WADA, K. KONDO, T. & KANEKO, S. (1999). Effects of zonisamide on K^{+} and Ca^{2+} evoked release of monoamine as well as K^{+} evoked intracellular Ca^{2+} mobilization in rat hippocampus. *Epilepsy Res.*, **35**, 173-82.
- 14) KITO, M. MAEHARA, M. & WATANABE, K. (1994). Antiepileptic drugs-calcium current interaction in cultured human neuroblastoma cells. *Seizure*, **3**, 141-149.
- 15) KITO, M. MAEHARA, M. & WATANABE, K. (1996). Mechanisms of T-type calcium channel blockade by zonisamide. *Seizure*, **5**, 115-119.
- 16) LE QUELLEC, A. DUPIN, S. GENISSEL, P. SAIVIN, S. MARCHAND, B. & HOUIN, G. (1995). Microdialysis probes calibration: gradient and tissue dependent changes in no net flux and reverse dialysis methods. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **33**, 11-16.
- 17) LIU, H. FORMAN, L.J. MONTOYA, J. EGGERS, C. BARHAM, C. & DELGADO, M. (1992). Determination of valproic acid by high-performance liquid chromatography with photodiode-array and fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, **576**, 163-169.
- 18) LOISEAU, P. & DUCHE, B. (1995). Carbamazepine Clinical Use. In *Antiepileptic drugs, Fourth edition*: ed.

- Levy, R.H., Mattson, R.H. & Meldrum, B.S. pp. 555-566. New York: Raven Press.
- 19) MATTSON, R.H. (1997). Carbamazepine. In *Epilepsy: a comprehensive textbook*: ed. Engel, Jr. J. & Pedley, T.A. pp. 1491-1502. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
 - 20) McLEAN, M.J. & MacDONALD, R.L. (1986). Carbamazepine and 10,11-epoxycarbamazepine produce use- and voltage-dependent limitation of rapidly firing action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**, 727-738.
 - 21) MIZUNO, K. OKADA, M. KANEKO, S. HIRANO, T. TOKINAGA, N. CHIBA, T. OTANI, K. & FUKUSHIMA, Y. (2000). Effects of carbamazepine on acetylcholine release and metabolism. *Epilepsy Res.*, **40**, 187-195.
 - 22) MIZUNO, K. OKADA, M. MURAKAMI, T. KAMATA, A. ZHU, G. KAWATA, Y. WADA, K. & KANEKO, S. (1994). Effects of zonisamide, carbamazepine and valproate on monoamine metabolism in rat striatum and hippocampus. *Jpn.J.Psychiatry Neurol.*, **48**, 406-408.
 - 23) NORTON, J.W. & QUARLES, E. (2000). Intravenous valproate in neuropsychiatry. *Pharmacotherapy.*, **20**, 88-92.
 - 24) OKADA, M. HIRANO, T. KAWATA, Y. MURAKAMI, T. WADA, K. MIZUNO, K. KONDO, T. & KANEKO, S. (1999a). Biphasic effects of zonisamide on serotonergic system in rat hippocampus. *Epilepsy Res.*, **34**, 187-197.
 - 25) OKADA, M. HIRANO, T. MIZUNO, K. CHIBA, T. KAWATA, Y. KIRYU, K. WADA, K. TASAKI, H. & KANEKO, S. (1997a). Biphasic effects of carbamazepine on the dopaminergic system in rat striatum and hippocampus. *Epilepsy Res.*, **28**, 143-153.
 - 26) OKADA, M. HIRANO, T. MIZUNO, K. KAWATA, Y. WADA, K. MURAKAMI, T. TASAKI, H. & KANEKO, S. (1998a). Effects of carbamazepine on hippocampal serotonergic system. *Epilepsy Res.*, **31**, 187-198.
 - 27) OKADA, M. KANEKO, S. HIRANO, T. ISHIDA, M. KONDO, T. OTANI, K. & FUKUSHIMA, Y. (1992). Effects of zonisamide on extracellular levels of monoamine and its metabolite, and on Ca^{2+} dependent dopamine release. *Epilepsy Res.*, **13**, 113-119.
 - 28) OKADA, M. KANEKO, S. HIRANO, T. MIZUNO, K. KONDO, T. OTANI, K. & FUKUSHIMA, Y. (1995). Effects of zonisamide on dopaminergic system. *Epilepsy Res.*, **22**, 193-205.
 - 29) OKADA, M. KAWATA, Y. KIRYU, K. MIZUNO, K. WADA, K. INOMATA, H. TASAKI, H. & KANEKO, S. (1997b). Effects of non-toxic and toxic concentrations of phenytoin on monoamines levels in rat brain. *Epilepsy Res.*, **28**, 155-163.
 - 30) OKADA, M. KAWATA, Y. KIRYU, K. MIZUNO, K. WADA, K. TASAKI, H. & KANEKO, S. (1997c). Effects of adenosine receptor subtypes on hippocampal extracellular serotonin level and serotonin reuptake activity. *J. Neurochem.*, **69**, 2581-2588.
 - 31) OKADA, M. KAWATA, Y. MIZUNO, K. WADA, K. KONDO, T. & KANEKO, S. (1998b). Interaction between Ca^{2+} , K^{+} , carbamazepine and zonisamide on hippocampal extracellular glutamate monitored with a microdialysis electrode. *Br. J. Pharmacol.*, **124**, 1277-1285.
 - 32) OKADA, M. KAWATA, Y. MURAKAMI, T. WADA, K. MIZUNO, K. KONDO, T. & KANEKO, S. (1999b). Differential effects of adenosine receptor subtypes on release and reuptake of hippocampal serotonin. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 1-9.
 - 33) OKADA, M. KIRYU, K. KAWATA, Y. MIZUNO, K. WADA, K. TASAKI, H. & KANEKO, S. (1997d). Determination of the effects of caffeine and carbamazepine on striatal dopamine release by *in vivo* microdialysis. *Eur. J. Pharmacol.*, **32**, 181-188.
 - 34) OKADA, M. NUTT, D. J. MURAKAMI, T. ZHU, G. KAMATA, A. KAWATA, Y. & KANEKO, S. (2001). Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J. Neurosci.*, **21**, 628-640.
 - 35) OKADA, M. WADA, K. KIRYU, K. KAWATA, Y. MIZUNO, K. KONDO, T. TASAKI, H. & KANEKO, S. (1998c). Effects of Ca^{2+} channel antagonists on striatal dopamine and DOPA release, studied by *in vivo* microdialysis. *Br. J. Pharmacol.*, **123**, 805-814.
 - 36) OKUMA, T. YAMASHITA, I. TAKAHASHI, R. ITOH, H. OTUKI, S. WATANABE, S. HAZAMA, H. & INAGAWA, K. (1990). Comparison of the antimanic efficacy of carbamazepine and lithium carbonate by double-blind controlled study. *Pharmacopsychiatry.*, **23**, 143-150.
 - 37) PAXINOS, G. & WATSON, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates: second edition*. San Diego: Academic Press.
 - 38) PIERCE, R.C. & KALIVAS, P.W. (1997). Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. *J. Neurosci.*, **17**, 3254-3261.
 - 39) PRATT, J.A. JENNER, P. & MARSDEN, C.D. (1985). Comparison of the effects of benzodiazepines and other anticonvulsant drugs on synthesis and utilization

- of 5-HT in mouse brain. *Neuropharmacology*, **24**, 59-68.
- 40) ROBERTS, W.M. JACOBS, R.A. & HUDSPETH, A.J. (1990). Colocalization of ion channels involved in frequency selective and synaptic transmission at presynaptic active zone of hair cells. *J. Neurosci.*, **10**, 3664-3684.
 - 41) ROCK, D.M. Macdonald, R.L. & Taylor, C.P. (1989). Blockade of sustained repetitive action potentials in cultured spinal cord neurons by zonisamide (AD 810, CI 912), a novel anticonvulsant. *Epilepsy Res.*, **3**, 138-143.
 - 42) SCHEFFER, I.E. BHATIA, K.P. LOPES-CENDES, I. FISH, D.R. MARSDEN, C.D. ANDERMANN, F. ANDERMANN, E. DESBIENS, R. CENDES, F. & MANSON, J.I. (1994). Autosomal dominant frontal epilepsy misdiagnosed as sleep disorder. *Lancet*, **343**, 515-517.
 - 43) SEINO, M. & ITO, T. (1997). In *Epilepsy: A Comprehensive Textbook : Zonisamide*. ed. Engel, J., Pedley, T.A. pp. 1619-1626. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
 - 44) SOLLNER, T. WHITEHEART, S.W. BRUNNER, M. ERDJUMENT, BROMAGE, H. GEROMANOS, S. TEMPST, P. & ROTHMAN, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, **362**, 318-324.
 - 45) SUDHOF, T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, **375**, 645-653.
 - 46) SUZUKI, S. KAWAKAMI, K. NISHIMURA, S. WATANABE, Y. YAGI, K. SEINO, M. & MIYAMOTO, K. (1992). Zonisamide blocks T-type calcium channel in cultured neurons of rat cerebral cortex. *Epilepsy Res.*, **12**, 21-27.
 - 47) TAKEBAYASI, M. MOTOHASHI, N. SAITO, H. KAGAYA, A. & YAMAWAKI, S. (1995). Effect of acute treatment with sodium valproate on catecholamine and serotonin synthesis in mouse cerebral cortex. *Neuropsychobiology*, **32**, 124-127.
 - 48) UEDA, Y. & TSURU, N. (1994). Bilateral seizure-related changes of extracellular glutamate concentration in hippocampi during development of amygdaloid kindling. *Epilepsy Res.*, **18**, 85-88.
 - 49) WADA, Y. NAKAMURA, M. HASEGAWA, H. & YAMAGUCHI, N. (1993). Intra-hippocampal injection of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) inhibits partial and generalized seizures induced by kindling stimulation in cats. *Neurosci. Lett.*, **159**, 179-182.
 - 50) WAHNSCHAFTE, U. & LOSCHER, W. (1991). Anticonvulsant effects of ipsilateral but not contralateral microinjections of the dopamine D2 agonist LY 171555 into the nucleus accumbens of amygdala-kindled rats. *Brain Res.*, **553**, 181-187.
 - 51) WESTERINK, B.H.C. HOFSTEEDE, H.M. DAMSMA, G. & DEVRIES, J.B. (1988). The significance of extracellular calcium for the release of dopamine, acetylcholine and amino acids in conscious rats, evaluated by brain microdialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **337**, 373-378.
 - 52) WESTERINK, B.H.C. HOFSTEEDE, R.M. TUNTJER, J. & DE VRIES, J.B. (1989). Use of calcium antagonism for the characterization of drug-evoked dopamine release from the brain of conscious rats determined by microdialysis. *J. Neurochem.*, **52**, 722-729.
 - 53) XU, T. BINZ, T. NIEMANN, H. & NEHER, E. (1998). Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity. *Nat. Neurosci.*, **1**, 192-200.
 - 54) YOSHIHARA, M. UEDA, A. ZHANG, D. DEITCHER, D.L. SCHWARZ, T.L. & KIDOKORO, Y. (1999). Selective effects of neuronal-synaptobrevin mutations on transmitter release evoked by sustained versus transient Ca^{2+} increases and by cAMP. *J. Neurosci.*, **19**, 2432-2441.
 - 55) YOSHIMURA, R. YANAGIHARA, N. TERAOKA, T. MINAMI, K. ABE, K. & IZUMI, F. (1995). Inhibition by carbamazepine of various ion channels-mediated catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **352**, 297-303.

Summary

Interaction Between Antiepileptic Drugs and SNAREs

Motohiro Okada, Gang Zhu, Shukuko Yoshida, Kazuaki Kanai
Hiroto Iwasa, Sunao Kaneko

To elucidate possible mechanisms underlying the effects of carbamazepine (CBZ), valproate (VPA) and zonisamide (ZNS) on neurotransmitter exocytosis, the interaction between these three antiepileptic drugs (AEDs) and botulinum toxins (BoNTs) on basal, Ca^{2+} - and K^{+} -evoked release of dopamine (DA) and serotonin (5-HT) were determined by microdialysis in the hippocampus of freely moving rats. Basal release of monoamine was decreased by pre-microinjection of the syntaxin inhibitor, BoNT/C, but only weakly affected by the synaptobrevin inhibitor, BoNT/B. Ca^{2+} -evoked release was inhibited by BoNT/C selectively. K^{+} -evoked release was reduced by BoNT/B predominantly and BoNT/C weakly. Perfusion with low- and high-concentration of both CBZ or ZNS increased and decreased basal monoamine release, respectively. Perfusion with VPA increased basal 5-HT release concentration-dependently, whereas basal DA release was affected by VPA biphasically, similar to CBZ and ZNS. This stimulatory action of AEDs on basal release was inhibited by BoNT/C predominantly. Ca^{2+} -evoked monoamine release was increased by low-concentration of CBZ, ZNS and VPA, but decreased by high-concentrations. These effects of the AEDs on Ca^{2+} -evoked release were inhibited by BoNT/C, but not by BoNT/B. K^{+} -evoked monoamine release was reduced by AEDs concentration-dependently. The inhibitory effect of these three AEDs on K^{+} -evoked release was inhibited by BoNT/B, but not by BoNT/C. These findings suggest that the therapeutic-relevant concentration of CBZ, VPA and ZNS affects exocytosis of DA and 5-HT, the enhancement of syntaxin-mediated monoamine release during resting stage, and the inhibition of synaptobrevin-mediated release during depolarising stage.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found.2002;14:61-74