

## 厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

## 総括研究報告書

新しい薬理学的および生物学的ツールを利用した  
グルタミン酸受容体コ・アゴニスト療法の開発に関する研究

主任研究者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部長

グルタミン酸受容体コ・アゴニスト療法を確立するため AMPA 型グルタミン酸受容体のコ・アゴニストである PEPA 並びに NMDA 型グルタミン酸受容体のコ・アゴニストである D-セリン誘導体の薬理的解析を昨年度に引き続き行った。その結果、PEPA は発現する AMPA 受容体の分子種の違いに基づく神経細胞の多様性の検出や神経回路機能の解析に有用で治療薬開発のリード化合物として優れた化合物であること、および D-サイクロセリンや D-セリンエチルエステルの運動失調症改善作用は個体レベルでも実際 NMDA 受容体を介してのものであることを確認した。また、D-セリンの代謝・生理機能解明のための解析ツールの開発を行った。さらに、代謝型グルタミン酸受容体の新たな解析用ツールであるアルファアミノピメリン酸、F2CCG-1 を用いて塩素イオン依存性の新たなグルタミン酸トランスポーターの存在を予測し、新たな生物学的ツールとしてグリア型グルタミン酸トランスポーター GLAST の遺伝子欠損マウスを開発した。

分担研究者 関口正幸 国立精神・神経センター  
神経研究所・  
疾病研究第四部長  
西川 徹 同・疾病研究第三部長  
篠崎温彦 (財) 東京都臨床医学総合  
研究所・  
薬理研究部門部長

ツールを導入する。コ・アゴニストとは神経伝達物質受容体において神経伝達物質-受容体の相互作用を修飾し受容体活性を最大限にまで引き出す物質のことである。コ・アゴニストシステムに働く薬物は、神経伝達物質結合部位に直接作用する薬剤と違い、投与量等で薬効を容易にコントロールでき、毒性の出現を低く押さえることができる。グルタミン酸が神経変性疾患等の有害因子であることを考慮すればグルタミン酸受容体のコ・アゴニストシステムに作用する薬剤を開発することは神経疾患治療の上で極めて理想的かつ有意義なことである。

## A. 研究目的

我々の最終到達目標は有効な治療薬のない難治性の神経疾患においてグルタミン酸受容体コ・アゴニスト療法という新しい療法を臨床的に確立することである。その達成にむけて PEPA (4-[2-(Phenylsulfonylamino)ethyl-thio]-2,6-difluorophenoxyacetamide)、D-セリン、グルタミン酸輸送蛋白欠損マウス、アルファアミノピメリン酸という申請者らの独自性が高い薬理的・生物学的

今年度は昨年度に引き続き AMPA 型受容体の理想的なコ・アゴニストである PEPA の薬理作用を細胞レベルで、また NMDA 型受容体のコ・アゴニストである D-セリンの誘導体の D-セリンエチルエステル及び D サイクロセリンの運動失調

症改善作用をモデルマウスを使用し検討した。さらに D-セリンの代謝や生理機能に関係する分子を単離・同定するための生化学・薬理学的研究および遺伝子クローニングを行ったほか、代謝型グルタミン酸受容体においてコ・アゴニストシステムが存在するかどうかの解析を通して新規のグルタミン酸トランスポーターの予測を行い、また新しい生物学的ツールであるグルタミン酸トランスポーター欠損マウスを発生工学的に作出した。

## B. 研究方法

### (1) PEPA システムに関して

海馬の初代神経細胞を用いて PEPA の作用をカルシウムイオン濃度画像解析法、パッチクランプ法にて検討した。また、アフリカツメガエル卵遺伝子発現系を利用し PEPA の薬理作用をパッチクランプ法にて解析した。

### (2) D-セリンシステムに関して

#### 1) D-セリン誘導体の抗運動失調作用

シトシンアラビノシド処理にて作製された小脳変性マウスおよび遺伝性小脳変性マウス (reeler, staggerer) を用いてオープンフィールド法で運動失調症改善作用を検討した。

#### 2) 代謝経路・生理機能の解明

各組織の D-セリン濃度は、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。D-セリントランスポーター活性はラット脳 mRNA を使用しアフリカツメガエル卵遺伝子発現系を利用して測定した。また D-セリンの代謝や機能に関連する未知分子の検索には RAP-PCR (RNA arbitrarily primed PCR) を用いた。

### (3) 代謝型グルタミン酸受容体に関して

アルファアミノピメリン酸の mGluR 応答増強作用に関するイオン要求性を生後 1-6 日の新生ラット摘出脊髄標本における単シナプス反応を指標に各種陰イオン輸送阻害剤の存在下で測定

した。

(4) 発生工学的手法による生物学的ツールの作出と解析に関して

129 系統由来の ES 細胞を使用しグリア型グルタミン酸トランスポーター GLAST 遺伝子のエクソン 6 が不活化した相同組換え体を常法に従い選別し、キメラマウス、遺伝子欠損マウスを C57BL/6J マウスとの交配により作製した。解析は以前に報告した GLT-1 欠損マウスの病態生理学的解析に倣った。

## C. 研究結果

### (1) PEPA システムに関して

AMPA に対する反応性 (カルシウムイオン濃度変化) が PEPA 添加により増強することを海馬初代培養系で見出した。増強の程度は一定でなく個々の細胞により異なっていた。同様な多様性はアフリカツメガエル卵遺伝子発現型において AMPA 受容体のスプライスバリエーションの比を変化させることによって人工的に再構築することが出来た。また、PEPA は分散培養系において神経細胞の自発性微小シナプス後電流の減衰時間経過に全く影響を与えないことを見出した。さらにアフリカツメガエル卵を用いた遺伝子発現系とパッチクランプ法を組み合わせ AMPA 受容体に対する PEPA の作用を検討し、既存の AMPA 受容体増強薬が脱感作と Deactivation の二つの過程の両方を修飾するのに対し PEPA は脱感作は強く抑制したが、Deactivation には殆ど作用しないことを昨年に引き続き確認した。

### (2) D-セリンシステムに関して

#### 1) D-セリン誘導体の抗運動失調作用

シトシンアラビノシド処理により作製された小脳変性マウスにおいて D-セリンエチルエステルの抗運動失調効果がグリシン結合部位の拮抗剤である 5,7-dichlorokynureate により抑制されることを確認した。また D-セリンエチルエステルは reeler マウスには有効であるが staggerer マウス

には無効であった。

## 2) 代謝経路・生理機能の解明

各種脳腫瘍で D-セリン濃度を測定したところ、グリア系に分化した組織を示す astrocytoma や oligodendrogloma などでは死後脳大脳皮質と同程度かそれより高かったが、末梢性の組織像を示す腫瘍や神経系・グリア系の未分化な腫瘍ではきわめて低かった。D-セリントランスポーターに関しては対照卵と比較してラット脳 mRNA を注入されたアフリカツメガエル卵では卵内の 3H-D-セリンのカウントが有意に増加していたため、mRNA の分画化によりトランスポーター遺伝子のクローニングの試みを続けている。未知分子の検索としては D-セリンに対して立体特異的 (L 体には反応しない) または D・L 体双方に反応する新規遺伝子を大脳新皮質から見だし、構造と機能を解析中である。

### (3) 代謝型グルタミン酸受容体に関して

強力な mGluR アゴニストである F2CCG-I [(2S,1'S,2'S)-2-(2-carboxy-3,3-difluorocyclopropyl) glycine] を短時間暴露すると、それを完全に洗浄した後で、alpha-アミノピメリン酸は単独で単シナプス脊髄反射の著しい抑制を起こすようになることを確認した。キスカル酸プライミングの例に倣って F2CCG-I プライミングと呼ぶがこの反応は陰イオン輸送阻害剤の DNDS (4,4-dinitrostilbene-2,2'-disulphonic acid) の同時投与により用量依存的に抑制された。

### (4) 発生工学的手法による生物学的ツールの作出と解析に関して

GLAST 欠損マウスは軽度の協調運動障害を示し、急性障害に対する防護力が小脳で低下していることを見出した。

## D. 考察

昨年度及び今年度の解析から、既存の AMPA 受容体活性化増強薬 (アニラセタム、サイクロサイアザイド) が受容体の脱感作と deactivation の両方

を修飾するのに対し、PEPA は deactivation には全く影響を及ぼさないことを確認した。PEPA のこの分子薬理学的特徴を海馬の分散培養系の解析に応用したところ、PEPA は神経細胞の自発性微小シナプス後電流の減衰時間経過に全く影響を与えないことを見出した。このことは自発性微小シナプス後電流の制御に AMPA 受容体の脱感作は関与していないことを示唆する。また、海馬神経細胞の初代培養を用いて、反応増強度を指標にすることにより、PEPA が神経細胞の多様性を数値的に検出することを示した。興味深いことに、同様の数値分布はアフリカツメガエル卵で発現する AMPA 受容体のスプライズバリエーションの比を変化させることで近似することが出来た。このことは発現する AMPA 受容体の分子種の違いが神経細胞の多様性に反映されていることを示唆する。

D サイクロセリン、D-セリンエチルエステルに運動失調症改善作用を認めることは昨年度報告した。異性体の L セリン誘導体に運動失調症改善作用を認めなかったことに加え、今年度は NMDA 受容体ストリキニン非感受性グリシン部位の拮抗剤の同時投与により D-セリンエチルエステルの運動失調症改善作用が抑制されることを示した。これにより D-セリンエチルエステルの作用は実際個体レベルでも NMDA 受容体を介してのものであることがほぼ確定した。また、D-セリンエチルエステルは reeler マウスには有効であったが staggerer マウスには無効であった。このことは D-セリンエチルエステルの効果は病型に依存する可能性を示唆する。

D-セリンは内在性因子として神経回路機能の制御に独自のシステムを構築している可能性が強く、D-セリン代謝経路の制御により運動失調症をはじめとする各種の神経疾患が治療される可能性もある。D-セリンの合成・分解経路についてはまだその全容が明らかではないが、グリア系脳腫瘍細胞が D-セリン取り込み活性を示したこ

とから D-セリン代謝経路解明のためのモデル系として今後有用度が高まると期待される。また、D-セリントランスポーターはじめ D-セリンの代謝・生理機能に関係する遺伝子群の単離が展望できる結果が得られた意義は大きい。

代謝型グルタミン酸受容体の解析で F2CCG-I プライミングが陰イオン輸送阻害剤の DNDS (4,4'-dinitrostilbene-2,2'-disulphonic acid) の同時投与により用量依存的に抑制されることが判明した。昨年 F2CCG-I プライミングの作用機序の検討から新たなグルタミン酸トランスポーターの存在の可能性を示したが今年度の結果と合わせこのトランスポーターは陰イオン依存性の新規のグルタミン酸トランスポーターである可能性が強まった。

新たに作製した GLAST 欠損マウスでは急性障害に対する防護力が小脳で低下しており、軽度の協調運動障害も存在した。この結果は以前に報告した GLT-1 欠損マウスに比べると臨床症状は軽微であるが GLAST 欠損マウスにおいてもグルタミン酸興奮毒性の影響が個体レベル存在することを示唆するものと思われる。

## E. 結論

D-セリン誘導体による運動失調療法は動物レベルでほぼ確立されてきた。今後は早期にヒトへの応用に取り組む必要がある。PEPA に関しては応用性の高い薬理学的特徴が改めて明らかとなった。今後の解析で治療対象疾患を特定していきたい。また、グルタミン酸トランスポーターに関しては新規分子の存在の可能性を見出し、新たな遺伝子欠損マウスを作製するなどの成果をあげることが出来た。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Watase, K., Hashimoto, K., Kano, M., Yamada, K., Watanabe, M., Inoue, Y., Okuyama, S., Sakagawa,

T., Ogawa, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K. and Tanaka, K. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice, *Eur. J Neurosci.*, 10, 976-988, 1998

2. Sekiguchi, M., Takeo, J., Harada, T., Morimoto, T., Kudo, Y., Yamashita, S., Kohsaka, S. and Wada, K., Pharmacological detection of AMPA receptor heterogeneity by use of two allosteric potentiators in rat hippocampal cultures, *Br. J. Pharmacol.*, 123, 1294-1303, 1998
3. Harada, T., Harada, C., Sekiguchi, M. and Wada, K., Light-induced retinal degeneration suppresses developmental progression of flip-to-flop alternative splicing in GluR1, *J. Neurosci.*, 18, 3336-3343, 1998
4. Harada, T., Harada, C., Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagawa, T., Nakayama, N., Sasaki, S., Okuyama, S., Watase, K., Wada, K., and Tanaka, K., Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 95, 4663-4666, 1998
5. Inage, Y.W., Itoh, M., Wada, K. and Takashima, S., Expression of two glutamate transporters GLAST and EAAT4 in the human cerebellum: Their correlation in development and neonatal hypoxic-ischemic damage, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57, 554-562, 1998
6. Saigoh, K., Matsui, K., Takahashi, K., Nishikawa, T. and Wada, K., The stereospecific effect of D-serine ethylester and D-cycloserine in ataxic mutant mice, *Brain Res.* 808, 42-47, 1998
7. Kojima, S., Nakamura, T., Nidaira, T., Nakamura, K., Ooashi, N., Ito, E., Watase, K., Tanaka, K., Wada, K., Kudo, Y. and Miyakawa, H. Optical detection of synaptically induced glutamate transport in hippocampal slices. *J. Neurosci.*, in press

8. Umino A, Takahashi K and Nishikawa T: Characterization of phencyclidine-induced increase in prefrontal cortical dopamine metabolism in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 124: 377-385, 1998
  9. Shinozaki, H. and Ishida, M.: A fluoride CCG derivative, F2CCG-I, as a useful pharmacological probe for elucidating physiological roles of mGluRs. In: *Metabotropic Glutamate Receptors and Brain Function* (eds. Moroni, F., Nicoletti, F. and Pellegrini-Giampietro, D.E. ). pp. 271-280. Portland Press Ltd., London, 1998
2. 学会発表
1. 和田圭司: 神経伝達物質受容体・トランスポーターの発生工学的機能解析と疾患モデルの作製. 第126回日本獣医学会ワークショップ「動物モデルー発生原理に基づいた神経疾患モデル研究の新しい展開」, 江別, 8. 23, 1998
  2. 和田圭司: グルタミン酸トランスポーター・受容体と脳機能障害. 日本薬学会第119年会シンポジウム「薬物動態研究と分子細胞生物学的研究の接点」, 徳島, 3. 31, 1999
  3. 関口正幸, 和田圭司: AMPA受容体の新しいアロステリックポテンシエーター: PEPA. 第21回日本神経科学第41回日本神経化学合同大会ミニシンポジウム「グリア細胞による神経伝達調節機構」, 東京, 9. 21, 1998
  4. 西川 徹: 精神疾患とグルタミン酸ーグルタミン酸と病態・疾患ー, 第2回神経伝達物質研究会「グルタミン酸最新の話」, 東京, 8. 22, 1998.
  5. 西川 徹、海野麻未、平岡秀一、金田小幸、土田英人、岩間久行、梶井 靖、山本直樹、黒田安計: 精神分裂病とNMDA受容体、第9回高次脳機能障害シンポジウム「創薬基盤としての神経科学は、今」, 京都, 10. 29-30, 1998.
  6. Ishida, M., Saitoh, T. and Shinozaki, H.: 'Priming' effect caused by F2CCG-I, an agonist for metabotropic glutamate receptors. XIII International Congress of Pharmacology, 1998. 7. 26 - 31, Munchen
  7. 石田美知子, 斎藤朋子, 丸山六三, 篠崎温彦: 新規グルタミン酸トランスポーターによる新生ラット脊髄での長時間シナプス抑制. 第72回日本薬理学会年会, 1999. 3. 22 - 25, 札幌.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

新しい薬理学的および生物学的ツールを利用した  
グルタミン酸受容体コ・アゴニスト療法の開発に関する研究

分担研究者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部長

シトシンアラビノシド処理により作製された小脳変性マウスにおいてDセリンエチルエステルの抗運動失調効果がグリシン結合部位の拮抗剤である 5,7-dichlorokynurenate により抑制されることを確認し、運動失調症に対する D-セリン誘導体の効果が実際 NMDA 受容体を介したものであることを示した。一部の遺伝性小脳変性モデルではD-セリン誘導体による改善作用を認めなかったことから病型により作用効果が異なる可能性を示した。また新たにグルタミン酸トランスポーターGLAST 欠損マウスを作製し、グルタミン酸興奮毒性の個体モデルとしての有用性を確認した。さらに、発現する AMPA 受容体の分子種の違いに基づく神経細胞の多様性の検出に PEPA が有用であることを示した。

A. 研究目的

グルタミン酸は主要な神経伝達物質であるが、他方、神経細胞死を引き起こす毒性を合わせ持ち、神経変性疾患等ではその発症、進行に関与する有害な因子になる。グルタミン酸の細胞毒性はグルタミン酸受容体を介して誘発されるためグルタミン酸受容体に作用する薬物は神経疾患等の治療薬になる可能性が極めて高い。特に伝達物質-受容体の相互作用を修飾し受容体活性を最大限に引き出す物質、つまりコ・アゴニストは従来の薬物では望めなかった低毒性で選択的な治療を可能にする。これまでに AMPA 型グルタミン酸受容体の理想的なコ・アゴニストである PEPA (4-[2-(phenyl-sulfonylamino)ethylthio]-2,6-difluorophenoxy acetamide)を発見し、NMDA(N-methyl-D-aspartate) 型グルタミン酸受容体の内在性のコ・アゴニストである Dセリンに運動失調症改善作用のあることを動物レベルで見い出した。また、グルタミン酸興奮毒性の個体モデルとしてグルタミン酸トランスポーターGLT-1 欠損マウスを

作製した。本年度はDセリン誘導体の運動失調症改善作用のメカニズムをさらに検討するとともに新たにグルタミン酸トランスポーターGLAST 欠損マウスを作製し、グルタミン酸興奮毒性の個体モデルとして可能性を検討した。また PEPA について細胞生物学的研究を行った。

B. 研究方法

- 1) 個体レベルでのDセリンエチルエステルの薬理作用を正常マウスならびにシトシンアラビノシド処理にて作製された小脳変性マウス (AraCマウス) あるいは遺伝性小脳変性マウス (reeler, staggerer) を用いて検討した。抗運動失調効果の判定はオープンフィールド法で行った。
- 2) 遺伝子欠損マウスの作製は 129 系統由来の ES 細胞を使用し常法通り行った。
- 3) カルシウムイオン濃度の画像解析装置を用いて海馬初代培養細胞の薬剤に対する反応を測定した。

### C. 研究結果

(1) Dセリンエチルエステルによる AraC マウスの運動失調症改善作用は NMDA 受容体のストリキニン非感受性グリシン部位の拮抗剤である 5,7ジクロロキヌレイン酸の投与により消失した。

(2) reeler マウスと異なり別の遺伝性小脳変性モデルマウスである staggerer マウスでは Dセリンエチルエステルによる運動失調症の改善を認めなかった。

(3) グリア型グルタミン酸トランスポーターのもう一つのサブタイプである GLAST を欠損したマウスを開発しその表現型を解析した。GLAST は成体脳では小脳優位に発現する。GLAST 欠損マウスは軽度の協調運動障害を示し、急性障害に対する防護力が小脳で低下していた。

(4) AMPA に対する反応性 (カルシウムイオン濃度変化) が PEPA 添加により増強することを海馬初代培養系で見出した。増強の程度は一定でなく個々の細胞により異なっていた。即ち、反応増強度を指標にすることにより、PEPA が神経細胞の多様性を数値的に検出することを示した。同様の数値分布はアフリカツメガエル卵で発現する AMPA 受容体のスプライスバリエーションの比を変化させることで近似することが出来た。

### D. 考察

D-セリンエチルエステルは NMDA 受容体のコ・アゴニストである Dセリンの誘導体である。構造異性体の Lセリン誘導体に運動失調症改善作用を認めなかったこと (昨年度報告)、NMDA 受容体ストリキニン非感受性グリシン部位の拮抗剤の同時投与により D-セリンエチルエステルによる運動失調症改善作用が消失したことから D-セリンエチルエステルの作用は NMDA 受容体を介してのものであることがほぼ確定した。また、D-セリンエチルエステルは reeler マウスには有効であったが staggerer マウスには無効であったことから病型により D-セリンエチルエステルの作

用が異なる可能性が考えられる。

グルタミン酸トランスポーターは細胞外グルタミン酸濃度を低く保ち神経細胞をグルタミン酸の興奮毒性から保護する重要な分子である。今年度はグリア型グルタミントランスポーターのもう一つのサブタイプである GLAST の遺伝子欠損マウスを作製・解析した。1997 年に報告した GLT-1 欠損マウスに比べると臨床症状は軽微であるが協調運動障害や小脳保護力の低下を認めたとことから GLAST 欠損マウスにおいてもグルタミン酸興奮毒性の影響が個体レベルで存在していることが想定される。

PEPA を用いた実験から、神経細胞の多様性に、発現する AMPA 受容体の分子種の違いが反映されている可能性が示唆された。

### E. 結論

Dセリン誘導体の運動失調症改善作用が NMDA 受容体を介したものであることを個体レベルで確認した。グルタミン酸トランスポーター GLAST 欠損マウスを作製し新たなグルタミン酸興奮毒性の個体モデルとしての有用性を見出した。神経細胞多様性の検出における PEPA の重要性を示した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Watase, K., Hashimoto, K., Kano, M., Yamada, K., Watanabe, M., Inoue, Y., Okuyama, S., Sakagawa, T., Ogawa, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K. and Tanaka, K. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice, *Eur. J Neurosci.*, 10, 976-988, 1998
2. Sekiguchi, M., Takeo, J., Harada, T., Morimoto, T., Kudo, Y., Yamashita, S., Kohsaka, S. and Wada, K., Pharmacological detection of AMPA receptor heterogeneity by use of two allosteric potentiators in

rat hippocampal cultures, *Br. J. Pharmacol.*, 123, 1294-1303, 1998

3. Harada, T., Harada, C., Sekiguchi, M. and Wada, K., Light-induced retinal degeneration suppresses developmental progression of flip-to-flop alternative splicing in GluR1, *J. Neurosci.*, 18, 3336-3343, 1998
4. Harada, T., Harada, C., Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagawa, T., Nakayama, N., Sasaki, S., Okuyama, S., Watase, K., Wada, K., and Tanaka, K., Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 95, 4663-4666, 1998
5. Inage, Y.W., Itoh, M., Wada, K. and Takashima, S., Expression of two glutamate transporters GLAST and EAAT4 in the human cerebellum: Their correlation in development and neonatal hypoxic-ischemic damage, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57, 554-562, 1998
6. Saigoh, K., Matsui, K., Takahashi, K., Nishikawa, T. and Wada, K., The stereospecific effect of D-serine ethylester and D-cycloserine in ataxic mutant mice, *Brain Res.* 808, 42-47, 1998
7. Kojima, S., Nakamura, T., Nidaira, T., Nakamura, K., Oashi, N., Ito, E., Watase, K., Tanaka, K., Wada, K., Kudo, Y. and Miyakawa, H. Optical detection of synaptically induced glutamate transport in hippocampal slices. *J. Neurosci.*, in press

## 2. 学会発表

1. 和田圭司: 神経伝達物質受容体・トランスポーターの発生工学的機能解析と疾患モデルの作製. 第126回日本獣医学会ワークショップ「動物モデル—発生原理に基づいた神経疾患モデル研究の新しい展開」, 江別, 8. 23, 1998
2. 和田圭司: グルタミン酸トランスポーター・受容体と脳機能障害. 日本薬学会第119年会シンポジウム「薬物動態研究と分子細胞生物学的研究の接点」, 徳島, 3. 31, 1999

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



## 厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

### 分担研究報告書

#### 新しい薬理学的および生物学的ツールを利用した グルタミン酸受容体コ・アゴニスト療法の開発に関する研究

分担研究者 関口正幸 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部室長

グルタミン酸受容体は高次脳機能の発現に極めて重要な分子である。グルタミン酸受容体の主要なサブタイプのひとつ AMPA 受容体の活性を強く増強する物質、PEPA、を見出し、昨年に引き続き解析を行った。PEPA は既存の薬物とは異なった分子薬理学的性質を有しており、分散培養系において神経細胞の自発性微小シナプス後電流の減衰時間経過に全く影響を与えなかった。PEPA の分子薬理学的特性を考慮すると、AMPA 受容体の脱感作は自発性微小シナプス後電流の制御に関与していないことが示唆される。

#### A. 研究目的

グルタミン酸受容体は脳機能発現上重要な神経伝達物質グルタミン酸に対する受容体である。グルタミン酸受容体のうち AMPA 受容体は興奮性シナプス伝達を仲介する。AMPA 受容体上のアロステリック部位とここに作用する薬物は、精神神経疾患の治療、記憶学習や精神神経機能発現のメカニズム解明のために有用であると推測されている。しかし、AMPA 受容体上のアロステリック修飾部位とこれに作用する薬物についての研究はまだ未成熟であり情報に乏しい。我々は、AMPA 受容体の新たなアロステリック修飾薬、PEPA、を開発し、その分子薬理学的特性を検討した。更に、培養細胞系におけるシナプス伝達に対する PEPA の作用を検討した。

#### B. 研究方法

分子薬理学的検討：ラット脳のグルタミン酸受容体をコードする遺伝子を、アフリカツメガエル卵母細胞に注入、受容体タンパクを発現させた。この細胞においてグルタミン酸による受容体活性化電流を Outside-out のパッチクランプ法にて記録した。

培養細胞からの電気生理学的記録：ラット胎児脳より神経細胞を取り出し分散培養した。培養 10 日目に、神経細胞から Whole cell のパッチクランプ法にて、自発性微小シナプス後電流 (mEPSC) を記録した (TTX, Picrotoxin, MK-801 存在下)。

#### C. 研究結果と考察

分子薬理学：AMPA 受容体におけるグルタミン酸シグナルの終結は AMPA 受容体を介するシナプス伝達の持続時間を決定する因子として重要であり、二つの過程が関与している。一つは、グルタミン酸濃度が低下したときに受容体が閉じる過程 (Deactivation)、一つは充分量のグルタミン酸継続存在下に受容体が閉じる過程 (脱感作) である。既存の AMPA 受容体増強薬はこの二つの過程の両方を修飾することが知られている。PEPA は脱感作は強く抑制したが、Deactivation には殆ど作用しなかった。この性質は、他の増強薬と異なる PEPA のユニークな性質であった。自発性 mEPSC：mEPSC は、神経インパルスとは無関係に、プレシナプス部位から微量の神経伝達物質がこぼれ落ちることにより誘起される小さいシナプス電流であり、最近、シナプスの構造維

持に重要なことが報告された。この mEPSC の減衰が AMPA 受容体の Deactivation、脱感作のいずれにより制御されているかを、PEPA を用いて検討した。その結果、PEPA は mEPSC の減衰過程に全く影響を与えなかった。このことは、mEPSC の減衰に脱感作過程が殆ど関与していないことを示唆する。

#### D. 結論

我々は、AMPA 受容体の新しいアロステリック修飾物質 PEPA の分子薬理学的特性を利用して、mEPSC の減衰に AMPA 受容体脱感作が関与しないことを見出した。

#### E. 研究発表

##### 1. 発表論文

Sekiguchi, M., Takeo, J., Harada, T., Morimoto, T., Kudi, Y., Yamashita, S., Kohsaka, S. and Wada, K., Pharmacological detection of AMPA receptor heterogeneity by use of two allosteric potentiators in rat hippocampal cultures, *Br. J. Pharmacol.*, 123, 1294-1303, 1998

##### 2. 学会発表

関口正幸, 和田圭司: AMPA 受容体の新しいアロステリックポテンシエーター: PEPA. 第 21 回日本神経科学第 41 回日本神経化学合同大会ミニシンポジウム「グリア細胞による神経伝達調節機構」, 東京, 9. 21, 1998

#### F. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

新しい薬理学的および生物学的ツールを利用した  
グルタミン酸受容体コ・アゴニスト療法の開発に関する研究

分担研究者 西川 徹 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部長

神経疾患の病態の理解や治療法開発に応用するため、NMDA 受容体の内在性コ・アゴニストの一つである Dセリンの代謝と生理機能を解析した。Dセリンがグリア系脳腫瘍に高濃度で含まれることを見だし、アフリカツメガエル卵母細胞の発現系や differential cloning 法により、Dセリンを取り込むトランスポーター遺伝子や Dセリンの代謝・機能に関与する遺伝子のクローニングの可能性を示した。

A. 研究目的

NMDA 型受容体のコ・アゴニストの一つである Dセリンは内在性因子として神経回路機能の制御に独自のシステムを構築している可能性が高まってきている。Dセリンの合成・分解経路や生理機能についてはまだその全容が明らかではないが、Dセリンのエステル誘導体が小脳変性モデルマウスにおける運動失調症を改善する作用を有することから（参照、和田の報告書）、Dセリンの代謝および生理的機能の解明により、運動失調症をはじめとする各種の神経疾患の病態の理解や治療薬の開発が大きく進展する可能性が出てきた。そこで本研究では、Dセリンの代謝や生理機能に関係する分子を単離・同定するための生化学・薬理学的研究および遺伝子クローニングを行った。

B. 研究方法

(1) Dセリンの測定

各組織や細胞外液中の Dセリン濃度は、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーを用いた、立体異性アミノ酸および非立体異性アミノ酸の一斉分析法により測定した。

(2) Dセリントランスポーター

ラット脳 mRNA をアフリカツメガエル卵に注入し数日の培養後、3H-Dセリンと 1時間インキュベーションした後の卵内 3H-Dセリンを測定した。

(3) 内在性 Dセリンの代謝・機能にかかわる未知分子の検索

D-セリンの代謝や機能に関連する未知分子を検索する方法のひとつとして、RAP-PCR (RNA arbitrarily primed PCR) を用い、D-または L-セリンのを全身的に投与した生後 8 日令のラットの脳内で発現が変化する遺伝子転写産物を解析した。

C. 研究結果

(1) 脳腫瘍組織における Dセリン濃度

各種脳腫瘍で Dセリン濃度を測定したところ、グリア系に分化した組織を示す astrocytoma や oligodendroglioma などでは死後脳大脳皮質と同程度かそれより高かったが、末梢性の組織像を示す腫瘍や神経系・グリア系の未分化な腫瘍ではきわめて低かった。

(2) Dセリントランスポーター

対照卵に比較してラット脳 mRNA を注入されたアフリカツメガエル卵では卵内の 3H-Dセリン

のカウントが有意に増加していたため、mRNAの分画化によりトランスポーター遺伝子のクローニングの試みを続けている。

(2) 内在性Dセリンの代謝・機能にかかわる未知分子の検索

Dセリンに対して立体特異的(L体には反応しない)またはD・L体双方に反応する新規遺伝子を大脳新皮質から見だし、構造と機能を解析中である。

#### D. 考察

従来の研究から、内在性Dセリンは少なくともグリア系細胞に多く含まれることが報告されてきたが、脳腫瘍組織でもこの所見が支持された。今回の結果は、グリア系脳腫瘍細胞がDセリンの合成能や取り込み能をもつことを示唆しており、in vitroにおけるDセリン代謝解析のモデル系として有用であると考えられた。一方、アフリカツメガエル卵母細胞の実験より、ラット脳にDセリンを取り込むトランスポーターが存在すると推察される。昨年度の研究ではDセリンやその誘導体がモデル動物の小脳性運動失調を改善することが明らかになったため、このようなトランスポーターの阻害物質は、細胞外液中Dセリンのシグナルを増強する運動失調治療薬として応用できる可能性があり、トランスポーター遺伝子のクローニングを進めるとともに、アフリカツメガエル卵母細胞や脳のホモジネートを用いた取り込み阻害スクリーニング系を検討中である。RAP PCR法を用いた研究では、Dセリンの代謝あるいは生理機能に関与する遺伝子転写産物の候補が見いだされた。今後、これらの遺伝子の構造解析を進め、発現実験を行う予定である。

#### E. 結論

Dセリンがグリア系脳腫瘍に高濃度で含まれることを見いだした。Dセリンを取り込むトランスポーター遺伝子やDセリンの代謝・機能に関与

する遺伝子のクローニングの可能性を示し、現在その作業を進めている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Umino A, Takahashi K and Nishikawa T: Characterization of phencyclidine-induced increase in prefrontal cortical dopamine metabolism in the rat. *Br J Pharmacol*, 124: 377-385, 1998.

2) Saigoh K, Matsui K, Takahashi K, Nishikawa T and Wada K: The stereospecific effect of D-serine ethylester and D-cycloserine in ataxic mutant mice. *Brain Res*, 808: 42-47, 1998.

3) 西川 徹: 抗精神病薬抵抗性分裂病症状の分子機構へのアプローチ 特集『情動・意欲の神経機構とその病態』、*脳の科学* 20: 781-788, 1998.

4) 山本直樹、西川 徹: d フェンサイクリジン、12 他の薬物依存と脳障害、*臨床精神医学講座* 第8巻 薬物・アルコール関連障害、中山書店、東京、印刷中

##### 2. 学会発表

1) 西川 徹: 精神疾患とグルタミン酸-グルタミン酸と病態・疾患一、第2回神経伝達物質研究会「グルタミン酸最新の話題」、東京、8.22, 1998.

2) 西川 徹、海野麻未、平岡秀一、金田小幸、土田英人、岩間久行、梶井 靖、山本直樹、黒田安計: 精神分裂病とNMDA受容体、第9回高次脳機能障害シンポジウム「創薬基盤としての神経科学は、今」、京都、10.29-30, 1998.

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金 (脳科学研究事業)

分担研究報告書

新しい薬理学的および生物学的ツールを利用した  
グルタミン酸受容体コ・アゴニスト療法の開発に関する研究

分担研究者 篠崎 温彦 (財) 東京都臨床医学総合研究所 部長

キスカル酸プライミングと F2CCG-I プライミングには多くの共通点があるが、キスカル酸プライミングには Na 依存性トランスポーターの関与が認められているのに反して、F2CCG-I の場合には Na 依存性成分は全くなく、Cl 依存性のグルタミン酸トランスポーターが関与する現象である。このトランスポーターの存在は今まで予想はされていたが、現実にはその実体は明らかにされていない。

A. 目的

Group II 型代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluR) アゴニストは単シナプス脊髄反射を用量依存性に抑制するため、これらの受容体アゴニストの応答を電気生理学的・薬理的に効率よく定量的に検出することができる。alpha-アミノピメリン酸は mGluR の応答を著しく増強することを見出したので、その作用機序について検討した。

B. 研究方法

生後 1-6 日の新生ラットを用いて、摘出脊髄標本を作成し、薬物は灌流適用した。

C. 研究結果と考察

alpha-アミノピメリン酸は低濃度でそれ自身何の作用も示さないにもかかわらず、脊髄標本に我々が最近開発した強力な mGluR アゴニストである F2CCG-I [(2S,1'S,2'S)-2-(2-carboxy-3,3-difluorocyclopropyl) glycine] を短時間暴露すると、それを完全に洗浄した後で、alpha-アミノピメリン酸は単独で単シナプス脊髄反射の著しい抑制を起こすようになる。我々は、キスカル酸 priming の例に倣って、この現象を F2CCG-I priming と呼ぶ。陰イオン輸送を阻害する DNDS

(4,4'-dinitrostilbene-2,2'-disulphonic acid, 3-100 (M) は DIDS と異なり、比較的高濃度を用いても、それ自身では単シナプス反射には影響を及ぼさない。そこで DNDS を F2CCG-I 適用前、適用中、適用後、及び alpha-アミノピメリン酸適用と同時に、の 4 通りの方法で適用したところ、F2CCG-I 適用前及び後では効果が無かった。即ち F2CCG-I ないし alpha-アミノピメリン酸と共に適用すると、用量依存的に priming を抑制する。

一方、[3H]キスカル酸 2 $\mu$ M を摘出脊髄に適用し、十分に洗浄した後、alpha-アミノピメリン酸 100 $\mu$ M を含む人工脳脊髄液を加えると、[3H]キスカル酸が叩き出される。Group III mGluR の代表的なアゴニストである L-AP4 (L-2-amino-4-phosphonobutyric acid) はキスカル酸 priming に関係することが知られている。L-AP4 (0.1 および 0.3 mM) を F2CCG-I と同時に適用すると、F2CCG-I priming は僅かに抑制される。これに関して、ラット大脳皮質 synaptoneurosome を L-AP4 で前処理すると、[3H]キスカル酸の synaptoneurosome への取り込みが約 3 倍に増強される。更に L-AP4 で処理し、洗浄した後は synaptoneurosome に取り込まれた [3H]キスカル酸が 1/3 に減少する。L-AP4 により、[3H]キスカル

酸が synaptoneurosome から叩き出されたのであろうか？ まだ正確な結論を得るに至っていない。

priming に関して、L-glutamate に加えて、DL-alpha-アミノスベリン酸、カルボシステイン、DL-2,6-ジアミノピメリン酸も alpha-アミノピメリン酸と同様な強力な作用があることが判明した。

#### D. 結論

キスカル酸 priming と F2CCG-I priming には多くの共通点が認められ、恐らく同じメカニズムによると思われるが、キスカル酸 priming には Na 依存性トランスポーターの関与が認められているのに反して、F2CCG-I priming には Na 依存性トランスポーターの関与は全くない。大体的見通しとして、F2CCG-I priming は陰イオン、恐らくは塩素イオン、依存性のグルタミン酸トランスポーターが関与する現象であろう。このトランスポーターの存在は今まで予想はされていたが、現実にはその実体は明らかにされていないため、その解明に向けたお膳立てができたといえよう。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shinozaki, H. and Ishida, M.: A fluoride CCG derivative, F2CCG-I, as a useful pharmacological probe for elucidating physiological roles of mGluRs. In: Metabotropic Glutamate Receptors and Brain Function (eds. Moroni, F., Nicoletti, F. and Pellegrini-Giampietro, D.E. ), pp. 271-280. Portland Press Ltd., London, 1998

##### 2. 学会等発表

Ishida, M., Saitoh, T. and Shinozaki, H.: 'Priming' effect caused by F2CCG-I, an agonist for metabotropic glutamate receptors. XIII International Congress of Pharmacology, 1998. 7. 26 - 31, Munchen

石田美知子, 斎藤朋子, 丸山六三, 篠崎温彦: 新規グルタミン酸トランスポーターによる

新生ラット脊髄での長時間シナプス抑制. 第 72 回日本薬理学会年会, 1999. 3. 22 - 25, 札幌.

#### F. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

