

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

高次脳機能障害における D-セリンシステムの
病態解明と治療法開発への応用に関する研究

総括研究報告書

(平成 16 年度)

主任研究者 西川 徹

平成 17 (2005) 年 3 月

総括研究報告書（平成 16 年度）

目 次

I. 総括研究報告

高次脳機能障害における D-セリンシステムの病態解明と
治療法開発への応用に関する研究

西川 徹 1

II. 分担研究報告

D-セリンシステムの分子機構とその高次脳機能障害における病態の解明

西川 徹 15

研究協力者 山本直樹, 谷口 豪, 海野麻未, 石井澄和,
嶋津 奈, 竹林裕直, 柏 淳

神経・グリア細胞死における D-セリンシステムの役割の解明

福井 清 23

脊髄小脳変性症に対するサイクロセリンの長期投与の検討

川井 充 25

III. 研究成果の刊行に関する一覧 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷 37

V. 平成 16 年度分担研究者氏名一覧 223

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
高次脳機能障害における D-セリンシステムの病態解明と治療法開発への応用
総括研究報告書

主任研究者 西川 徹 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科精神行動医科学・教授

研究要旨 本研究では、高次脳機能障害の分子病態を明らかにし新しい治療法の手がかりを得るため、D-セリンが、高次脳機能に深く関わる NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化に必須で、精神神経疾患の症状を改善する作用をもつ脳の内在性物質である点に注目し、脳の D-セリンの代謝・機能と高次脳機能障害における病態の分子機構を検討している。動物実験およびヒトを対象としたこれらの研究は、主任・分担研究者が所属する各施設の倫理委員会の承認を得た上、ガイドラインを遵守して行った。

初年度は、脳の内在性 D-セリン関連遺伝子として主任研究者らが単離した、D-セリン選択的応答を示す *dsr-2* と、D-セリンの細胞内蓄積を減少させる *dsm-1* の解析を進め、*dsr-2* は、1)ゲノム上、NMDA 受容体機能に影響する *neurexin-3alpha* の反対鎖に位置し、2)脳選択的で D-セリンや NMDA 受容体 R2B サブユニットと酷似した分布と発達に伴う分布変化を示すこと、等が見出され、D-セリンや NMDA 受容体の調節への関与が示唆された。*dsm-1* は、細胞内の内在性 D-セリン濃度も減少させ、脳内分布は D-セリンと類似していること、ほ乳類培養細胞に発現させた蛋白は主に細胞質に認められること等から、D-セリンの細胞内外の膜を介した輸送や代謝の過程で重要な役割を果たす可能性が推測された。

また、D-セリン分解活性をもつ D-アミノ酸酸化酵素は、大脳グリア細胞に存在し、D-セリンが過剰になるとその分解を介して細胞死に関与することが示唆された。さらに、本酵素の X 線結晶構造解析にも成功した。

一方、脊髄小脳変性症患者において、NMDA 受容体機能促進作用をもつ D-サイクロセリンの失調症状改善効果は少なくとも3ヶ月間持続することがわかった。D-サイクロセリンは、ラットへの全身投与時に、大脳新皮質の組織中および細胞外液中の D-セリン濃度を有意に上昇させることが観察された。

分担研究者

福井 清

徳島大学分子酵素学研究センター
教授

川井 充

国立病院機構東埼玉病院
副院長

の患者を長期にわたって苦しめており、新しい治療法の開発が急務となっている。近年、脳画像と神経生理学的・神経心理学的検査法を用いた病態の把握や診断は飛躍的な進歩を遂げてきたものの、薬物療法開発に繋がる分子レベルでの病態解析は難航している。

そこで本研究では、1) NMDA 型グルタミン酸受容体は高次脳機能の発達・発現・制御等に重要な役割を果たす、2) NMDA 受容体遮断薬により、種々の認知機能障害や、大脳および小脳の統合機能障害等の高次脳機能が引き起こされる、3) NMDA 受容体のコ・アゴニスト（それ自身は伝達物質ではないが、

A. 研究目的

高次脳機能障害は、脳血管障害、神経変性疾患、神経発達障害、その他の様々な神経疾患によって引き起こされ、現状では十分な回復が得られない症状が多いため、膨大な数

伝達物質とは異なる部位に作用して受容体機能を促進し、伝達物質であるグルタミン酸が生理的機能を発揮するためにその存在が不可欠な分子)は統合失調症状および小脳失調症状やそれらの動物モデルを改善することが報告されている、4)D-セリンは NMDA 受容体の内在性コ・アゴニストであり、独自の代謝・機能系 (D-セリンシステム) をもつことが示唆される、などの点に着目し、内在性 D-セリンの代謝・機能および高次脳機能障害における病態の分子機構を解明する。さらに、これらを標的として D-セリンシグナルを調節する、高次脳機能障害の新しい治療法開発を目指す。

このため、初年度は、D-セリンシステム関連分子に関する研究として、本研究の開始以前に主任研究者らがクローニングした、D-セリン選択的に応答を示す遺伝子 *dser-2* (D-serine responsive transcript-2) と、D-セリンの細胞内蓄積を減少させる *dsm-1* (D-serine responsive transcript-2) の分布、細胞内局在、機能等の解析を中心に進めた。これらの課題と並行して、a) D-セリンシステムと脳の細胞死との関連の検討、および b) NMDA 受容体コ・アゴニストとして作用する D-サイクロセリンによる脊髄小脳変性症 (SCD) 治療の臨床試験を行った。この臨床試験は、従来 D-サイクロセリンの 2 週間投与の効果について検討してきたため、今回は、SCD に対してサイクロセリンを 1 日 50mg 経口で 12 ヶ月間の長期にわたって投与しその有用性や副作用の有無について調べた。

B. 研究方法

今回報告した動物実験およびヒトを対象とした研究は、主任および分担研究者が所属する各施設の倫理委員会の承認を得た上、ガイドラインを遵守して行った。

(1) 脳の D-セリンの代謝・機能の分子機構に関する研究

1. 対象および試薬

実験には、1) 8 日齢および 50 日齢の Wistar 系雄性ラット、2) アフリカツメガエル卵母細胞、3) COS 株化培養細胞、4) PC12 株化培養細胞および 4) 生後 1-2 日齢ラット大脳皮質より調整した初代培養の I 型ならびに II 型アストロサイト等を用いた。アフリカツメガエル卵母細胞への D-セリン蓄積を観察する一部の実験では、 $[3H]D-serine$ (Moravek Biochemicals Inc.) を使った。

2. Northern blotting および Southern blotting

Northern blotting は、ラット大脳新皮質から抽出した poly(A)+ および poly(A)- RNA をアガロースゲル電気泳動の後、ナイロンメンブレンに転写し、*dser-2* に対する $[32P]UTP$ で標識したアンチセンス RNA プローブを合成してハイブリダイゼーションさせた。Southern blotting は、ラット大脳新皮質から抽出した genomic DNA を、BamHI、EcoRI、HindIII の 3 種類の制限酵素で切断後アガロースゲル電気泳動にもちいた。 $[32P]dCTP$ で標識した cDNA プローブによりハイブリダイゼーションをおこなった。

3. 半定量 RT-PCR

dser-2 および *dsm-1* の、種々の組織や細胞における発現と、それらの発達あるいは分化に伴う変化を比較するため、半定量 RT-PCR を行った。さらに一部の解析では、より高い定量性を期すために、同一チューブ内において内部標準となるプライマー (28S ribosomal RNA, rRNA) と同時に増幅することにより、サンプルの個体差およびサンプル間のばらつきをコントロールした。電気泳動後に 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide で染色した 1xTAE (40 mM Tris acetate, 1 mM EDTA) 含有 3% NuSieve 3:1 アガロースゲル (Cambrex) における個々のバンドの UV 照射時のシグナル強度を蛍光イメージアナライザー (Lumi-Imager, Roche) にて解析した。

4. *dser-2* 遺伝子の構造解析

Southern blotting にもちいた *dser-2* cDNA プローブによりラットジェノミック PAC (P1-

derived artificial chromosome)ライブラリーをハイブリダイゼーション法にてスクリーニングし、陽性クローンを単離した。ショットガンベクターpUC118 にサブクローニングの後、ショットガン・シーケンスにて決定した配列をアセンブリーソフトをもちいて dsr-2 遺伝子を含む pPAC4 クローンのインサート全長の一次構造を決定した。

5. アフリカツメガエル卵母細胞へのアミノ酸蓄積の観察と Dsm-1 蛋白の発現

D-セリンおよびその他アミノ酸のアフリカツメガエル卵母細胞への蓄積は、メデイウム中に外来性の各種アミノ酸を添加した条件と添加しない条件で 1 時間観察した。また、D-セリンの蓄積は、 $[3H]D$ -serine を用いて放射活性を測定する方法と、非標識体を HPLC (高速液体クロマトグラフィー) で分離・定量する方法で解析した。以上のアミノ酸蓄積が、卵母細胞内に Dsm-1 蛋白を発現させることによってどのように変化するかを調べるため、ラット大脳新皮質から dsm-1 の cRNA を *in vitro* で合成して卵母細胞に微量注入 (50 nl) し、2 日後にアミノ酸の蓄積実験を行った。対照群としては、溶媒の RNase-free H₂O または上記 cRNA の antisense strand を注入した。

6. *In vivo* ダイアリシス

前頭葉の細胞外液中の D-セリンおよび他のアミノ酸は、マイクロダイアリシス法により測定した。すなわち、ペントバルビタール (40mg/kg、腹腔内注射 (i.p.)) 麻酔下で、ステレオタキシーを使い、透析プローブ (エイコム社製 (A-I-4-03)、透析膜部位の長さが 3mm のもの) を内側前頭葉皮質 (AP +3.2mm, RV -0.6mm, VL+5.2mm) に埋め込んだ。薬物投与実験は、手術 2 日後に行い、プローブ内への Ringer 液 (NaCl, 147 mM; KCl 4 mM; CaCl₂, 1.3 mM; pH 7.3) の持続的灌流を開始した (流速 2 μ l/min)。脳内の細胞外液中の低分子を含む灌流液は、マイクロフラクションコレクターにより 0.8ml バイアル内へ蓄積して 20 分毎に回収し、-80°C で保存した。

7. 高速液体クロマトグラフィーを用いたアミノ酸の定量

各サンプル中の遊離型アミノ酸は、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC) によって測定した。凍結保存しておいたサンプルは、測定時に融解し、キラルアミノ酸の分離のため、Bos-L-Cys を加えて誘導体化した後、さらに蛍光測定用誘導体化のため OPA を添加した。前処理が終わったサンプル中のアミノ酸を、逆相カラム (Nova-PakC18 (300 \times 3.9mm,i.d, Waters, Japan)) で分離した後、蛍光検出器 (821-FPS spectrofluorometer (Jasco international CO. Ltd, Japan)) により、励起光波長 344nm、検出波長 433nm で定量した。

8. セリンヒドロキシメチル基転移酵素活性の測定

ラット肝臓ホモジネートを DL-[3-14C]セリン 1mM、ピリドキサルリン酸、テトラヒドロ葉酸存在下に、リン酸カリウムバッファー中でインキュベートし、生成した標識ヒドロキシメチルテトラヒドロ葉酸を検出した。

(2) D-セリンおよび D-アミノ酸酸化酵素と脳の細胞死に関する研究

D-アミノ酸酸化酵素に関する分子酵素学的研究を基盤として、分子のレベルから、中枢神経組織を構成する細胞・組織レベルの解析を行い、脳の細胞死における D-セリンとその分解活性をもつ本酵素の生理的・病態生理学的意義を明らかにする。

(3) 小脳失調に対する D-サイクロセリンの効果に関する研究

歩行可能な SCD 患者を対象とした。同意を得るのに支障がある高次脳機能障害をみとめる例は除外した。さらにサイクロセリンはてんかん患者にたいしては禁忌であるとされているので、今回の対象から DRPLA 患者やてんかんの既往のある患者は除外した。診断については診断の内訳は、遺伝子診断を希望した方について施行したが、SCA6 患者以外は、全て CAG repeats 数は正常範囲であった。

18 例で投与を開始したが本人が途中で中止を希望した 3 人、タルチレリンの併用を希望したため本研究からはドロップアウトした 2 人、途中で転医した 1 人は本検討から除外し最終的に 12 人で検討した。副作用により中止した例はなかった。最終的な診断の内訳は、多系統萎縮症(MSA-C)6 例、小脳皮質萎縮症(CCA)4 例、SCA6 2 例であった。男性 7 例女性 5 例、年齢は 56.3 ± 8.5 歳であった。

実際の方法は、まずインフォームドコンセントを取り患者本人から文書で同意を得た。投与方法はサイクロセリン 1 日 50mg を 2 分割経口投与とした。投与前、投与 2 週間後、3 ヶ月後、6 ヶ月後、9 ヶ月後、12 ヶ月後に評価した。評価項目は、International cooperative ataxia rating scale (ICARS) (World Federation of Neurology 1997) を用いた。また問診、神経学的診察、血液生化学検査、尿検査、心電図検査、脳波を同時に行い副作用の有無を検討した。すべて当施設の倫理委員会で承認されたプロトコールに従っておこなった。

統計方法は、ICARS の点数を Friedman の順位による分散分析 2 元配置を用い有意であればさらに 2 群間の差の有無を Wilcoxon の順位検定で検討した。すべて危険率 5%以下を有意と判定した。

C. 研究結果

(1) 脳の D-セリンの代謝・機能の分子機構に関する研究

1. dsr-2 遺伝子の解析

dsr-2 遺伝子は、ラットゲノムにおいて neurexin3alpha (nrxn3) 遺伝子の第 5 インترون中の反対鎖にコードされ、マウスやヒトでもこの関係は共通である特徴が明らかとなった。dsr-2 mRNA は脳特異的に発現しており、脳内分布とその発達による変化は、D-セリン濃度や NMDA 受容体 R2B サブユニット mRNA と酷似していることがわかった。これに対して、nrxn3 は脳と精巣に選択的に発現

していた。脳内の分布は小脳にも比較的多くの発現が見られることと、大脳新皮質および小脳における発現が生後 8 日齢と 50 日齢の間でほとんど変化しない点、dsr-2 と異なっていた。小脳におけるは異なる部分があることがわかった。

2. dsm-1 遺伝子の解析

dsm-1 は脳と肝臓で選択的に転写され、脳内の発現は、大脳新皮質、海馬、線条体、前脳部辺縁系領域等で多く、中脳では中等度、小脳や橋・延髄では少ない、D-セリン濃度の分布と同様の傾向を示した。また、アフリカツメガエル卵母細胞に Dsm-1 蛋白を発現させると、培養液中に加えた外来性の D-セリンの蓄積だけでなく、卵母細胞内の内在性 D-セリンも減少することが観察された。一方、ほ乳類細胞 COS に強制発現した標識 Dsm-1 蛋白は、クラスリンと類似して、核周囲を中心とした細胞質に分布していた。

3. 脳の D-セリン遊離におけるグリア細胞の役割

In vivo マイクロダイアリシス法により、選択的・可逆的グリア毒であるフルオロクエン酸を還流したラットの内側前頭葉皮質においては、細胞外液中の D-セリン濃度とグルタミン濃度がそれぞれ 20-30%程度と 80%以上減少し、グリシン、タウリン、L-セリンは逆に増加した。

4. D-サイクロセリンの脳内 D-セリン代謝に及ぼす影響

NMDA 受容体機能を促進することにより、小脳失調を改善する効果を発揮する D-サイクロセリンは、ラットへの全身投与により大脳新皮質内の組織中および細胞外液中の D-セリン濃度を上昇させることや、ラット肝臓由来セリンヒドロキシメチル基転移酵素の活性を抑制すること等が明らかになった。

(2) D-セリンおよび D-アミノ酸酸化酵素と脳の細胞死に関する研究

これまでに、新生ラット脳から初代グリア分離培養を行い、タイプ 1 アストロサイトにお

ける DAO 遺伝子の発現を報告した。そこで、D-セリンが実際にアストログリア細胞で発現されている D-アミノ酸酸化酵素によって代謝されるのか否か、またその代謝の結果細胞がどのような影響を受けるかについて検討した。まずラットの C6 細胞(glioma cell line)およびラット初代培養アストロサイトを用いて、D-アミノ酸添加後の細胞の変化を解析した。C6 細胞の DAO 発現量を Western blot 法を用いて観察したところ、かなり低い発現量でしか検出されなかった。次に、mouse DAO 遺伝子を組み込んだ mammalian expression vector を用い恒常的に発現が認められる細胞 (stable transformant) を作製し、D-セリンを添加したところ、濃度依存的に細胞死が誘導されるのが観察された。このことは、DAO 遺伝子発現量が比較的高い小脳由来の初代培養アストロサイトでの観察結果と一致し、DAO 遺伝子の発現量が高い細胞では、D-セリンがアストログリア細胞で代謝された結果、細胞死が誘導されることを示唆するものであった。この現象は、D-セリンの代謝により生成された過酸化水素の作用であると考えられ、この細胞死は DAO の阻害剤である安息香酸の添加によって抑制された。

(3) 小脳失調に対する D-サイクロセリンの効果に関する研究

サイクロセリン投与 2 週後、ICARS の総点と姿勢・歩行で投与前に比較して有意な改善をみた。3 ヶ月後の結果も同様に ICARS の改善は有意に持続していた。投与 6 ヶ月後以降では ICARS の投与前との有意差はみられなくなったが悪化はしていなかった。

自覚症状では副作用はなくまた検査結果も問題となるような有意な変化はなかったが運動失調そのものは少しずつ進行した。また MSA-C 6 例中 5 例で以前から存在していた錐体外路症状も次第に悪化しており ICARS のスコアへの影響も考えられた。CCA や SCA 6 では錐体外路症状を含め運動失調以外の神経徴候は投与中に出現しなかった。

D. 考察

(1) 脳の D-セリンの代謝・機能の分子機構に関する研究

初年度は、本研究事業開始前から検索を行ってきた *dsr-2* 遺伝子および *dsm-1* 遺伝子の、構造、分布等の関する研究が進展した。また、脳内 D-セリンとグリア細胞との関連ならびに D-サイクロセリンが D-セリン代謝に与える影響について新知見が得られた。

dsr-2 mRNA の発現分布と生後発達に伴う変化が、D-セリンおよび NMDA 受容体 R2B サブユニットと酷似してことから、*dsr-2* や産生蛋白質は、NMDA 受容体、D-セリンの機能、代謝およびそれらの相互作用の調節に関与することが示唆された。また、*dsr-2* 遺伝子がゲノム上で *nrxn3 α* 遺伝子の反対鎖にマップされる特異な構造をもつことから、*dsr-2* が、NMDA 受容体の機能調節が報告されている *nrxn3 α* の遺伝子発現を制御する可能性がある。

dsm-1 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞では、D-セリンの細胞内濃度あるいは蓄積量を変化し、COS 細胞に強制発現させた標識 *Dsm-1* 蛋白質が核周囲を中心として主に細胞質に認められること、この細胞内分布はクリスタリンとの類似点が多いこと等より、ゴルジ装置に多く存在し、D-セリンの細胞小器官への移行や代謝に関与する可能性が推測された。ただし、細胞膜に移動して D-セリン放出に関与する可能性も否定できない。

マイクロダイアリシスの実験では、選択的・可逆的グリア毒であるフルオロクエン酸の灌流によって、細胞外のグルタミンが著明に減少し、グリア細胞の活動性低下が支持された。したがって、フルオロクエン酸による細胞外 D-セリンの低下は、NMDA 受容体の活動性を維持するのに必要な D-セリン濃度の調節に、グリア細胞が関与することを示唆している。

さらに、本研究事業でも臨床応用試験を進めている D-サイクロセリンが、D-セリンの

組織および細胞外の濃度を増加させることを明らかにした。これらのデータは、本剤が内在性 D-セリンシグナルを強める可能性を初めて示唆したものであり、臨床用量の検討に有用と考えられる。

(2) D-セリンおよび D-アミノ酸化酵素と脳の細胞死に関する研究

本年度のデータから、観察された細胞死が D-セリンの D-アミノ酸化酵素による代謝の結果引き起こされた現象であることが予想され、脳においては、D-セリンの代謝にアストログリア細胞に存在する DAO が積極的に関与することが示唆された。

(3) 小脳失調に対する D-サイクロセリンの効果に関する研究

本年度の検討では、サイクロセリンの SCD への臨床効果は少なくとも 3 ヶ月は持続することが示された。SCD へのグルタミン酸性ニューロン、グルタミン酸受容体の関与についてはこれまでも様々な報告がある。小脳皮質の顆粒細胞から出るプルキンエ細胞を刺激する parallel fiber は、グルタミン酸がトランスミッターでありこの経路に障害がおきればプルキンエ細胞の興奮は抑制され小脳機能に障害がおこりうる。さらにこれまでに遺伝性のオリーブ橋小脳萎縮症で、GDH の活性低下や小脳皮質のグルタミン酸の減少が報告されている。また動物実験では、NMDA 受容体の阻害剤が他の精神症状に加えて小脳失調も引き起こすことがみられている。また動物実験でサイクロセリンが SCD のモデル動物に有効であった報告もありサイクロセリンが SCD に対する有用性の根拠となりうると考えられる。

一方、SCD を含む様々な変性疾患で NMDA 受容体を介した興奮刺激が過剰になり神経細胞が障害されるという仮説が提唱されており、OPCA についても同様の推定をする報告もある。グルタミン酸アゴニストは、過度に投与した場合には細胞毒性を呈する可能性はあるが、サイクロセリンは partial agonist であり、

もともと細胞毒性は低いと考えられる。またサイクロセリンは、これまでに抗結核薬として投与されているので、人間への長期投与のデータがすでに存在する。副作用としては、悪心等の軽度の消化器症状以外に精神神経系症状としてめまい、頭痛、まれに振戦、眠気、反射亢進、てんかん様発作が報告されている。これらの一部は、本剤のもつ NMDA の glycine site の partial agonist の作用によると考えられる。副作用の中で非可逆的なものは報告されていない。また今回の検討では、抗結核薬として投与する一日 500 ミリグラムよりはるかに少ない 1 日 50 ミリグラムで効果をえており、副作用もみられていない。MSA-C 症例でみられた錐体外路症状の投与中の悪化については、もともと投与前から錐体外路症状が存在しており、投与を終了した後も錐体外路症状は進行しているのもともとの MSA の症状によるものと考えた。ただし今回は対照群を設定していないため厳密な意味で運動失調症状を含めサイクロセリン投与群と偽薬群で SCD の症状の変化に差異がないかは検討できていない。今後は長期投与でも偽薬群を設定し二重盲検の必要性があると思われる。

今回の検討では少数例であるが、サイクロセリンは SCD の運動失調症状に対し少なくとも 3 ヶ月程度は効果が持続することがわかった。今後、二重盲検や、クロスオーバー試験による効果及び至適用量の検討がとくに重要であると考えられた。

E. 結論

初年度は、脳の内在性物質 D-セリンの関連候補遺伝子 *dsr-2* と *dsm-1* について、発現分布、ゲノム構造、細胞内局在、D-セリンとの相互作用等の特徴を明らかにした。また、D-セリンとグリア細胞との関係、D-セリン過剰の病態生理学的意義、D-サイクロセリンの高次脳機能障害治療効果等について新知見を得た。

(1) 脳の D-セリンの代謝・機能の分子機構に

関する研究

脳の内在性 D-セリン関連遺伝子として主任研究者らが単離した、D-セリン選択的応答を示す *dsr-2* と、D-セリンの細胞内蓄積を減少させる *dsm-1* の解析を進め、*dsr-2* は、1)ゲノム上、NMSDA 受容体機能に影響する *neurexin-3alpha* の反対鎖に位置し、2)脳選択的で D-セリンや NMDA 受容体 R2B サブユニットと酷似した分布と発達に伴う分布変化を示すこと、等が見出され、D-セリンや NMDA 受容体の調節への関与が示唆された。*dsm-1* は、細胞内の内在性 D-セリン濃度も減少させ、脳内分布は D-セリンと類似していること、ほ乳類培養細胞に発現させた蛋白は主に細胞質に認められること等から、D-セリンの細胞内外の膜を介した輸送や代謝の過程で重要な役割を果たす可能性が推測された。今後さらに、遺伝子改変動物の作製等による機能的意義についての詳細な解析が必要である。

一方、*in vivo* の実験により、細胞外 D-セリンシグナルの調節にグリア系細胞が重要な役割を果たすことを示す所見が個体レベルで初めて得られた。細胞外 D-セリンシグナルは、高次脳機能障害において異常を来す可能性が高く、治療の標的ともなるため、この調節系の分子機構解明を重点的課題のひとつとして検討を進めている。

(2) D-セリンおよび D-アミノ酸酸化酵素と脳の細胞死に関する研究

D-セリン分解活性をもつ D-アミノ酸酸化酵素が脳グリア細胞に存在し、D-セリンが過剰になるとその分解を介して細胞死に関与することが示唆された。したがって、中枢神経系において、D-アミノ酸酸化酵素は、脳内在性 D-セリンの代謝を司るキーエンザイムとして、D-セリンシステムの生理的また病態

生理学的意義をもつと推測された。

(3)小脳失調に対する D-サイクロセリンの効果に関する研究

D-サイクロセリンは、SCD の治療に有効である可能性があり効果は少なくとも 3 ヶ月は持続することが示唆された。また、脳内 D-セリン代謝に影響することがわかり、臨床用量の設定の上で考慮が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 原著

1. Fujii R, Okabe S, Urushido T, Inoue K, Yoshimura A, Tachibana T, Nishikawa T, Hicks GG, Takumi T: The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology. *Curr Biol*, 15: 587-593, 2005.
2. Aoki-Suzuki M, Yamada K, Meerabux J, Iwayama-Shigeno Y, Ohba H, Iwamoto K, Takao H, Toyota T, Suto Y, Nakatani N, Dean B, Nishimura S, Seki K, Kato T, Itohara S, Nishikawa T, Yoshikawa T: A family-based association study and gene expression analyses of *netrin-G1* and *-G2* genes in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 57: 382-393, 2005
3. Inoue K, Yamada A, Fujii R, Nakatani J, Matsubara C, Ishii M, Aburatani H, Umino A, Nishikawa T, Takumi T: *Fez1* is layer-specifically expressed in the adult mouse neocortex. *Eur J Neurosci* 20: 2909-2916, 2004.
4. Sakurai S, Ishii S, Umino A, Shimazu D, Yamamoto N, Nishikawa T: Effects of psychotomimetic and antipsychotic agents

- on neocortical and striatal concentrations of various amino acids in the rat. *J Neurochem* 90: 1378-1388, 2004.
5. Fukasawa M, Aoki M, Yamada K, Iwayama-Shigeno Y, Takao H, Meerabux J, Toyota T, Nishikawa T, Yoshikawa T: Case-control association study of human netrin G1 gene in Japanese schizophrenia. *J Med Dent Sci* 51: 121-8, 2004.
 6. Sakai T, Liu L, Teng X, Mukai-Sakai R, Shimada H, Kaji R, Mitani T, Matsumoto M, Toida K, Ishimura K, Shishido Y, Mak TW, Fukui K: Nucling Recruits Apaf-1/Procaspase-9 Complex for the Induction of Stress-Induced Apoptosis. *J Biol Chem*, 279: 41131-41140, 2004.
 7. Liu L, Sakai T, Sano N, Fukui K: Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor κ B signalling. *Biochem J*, 380: 31-41, 2004.
 8. 川添 僚也, 小野 公嗣, 朴 煥埼, 頼田 和子, 富田 優美子, 福井 清: D-アミノ酸バイオシステムによる哺乳類の中樞神経機能の制御, --- 脳内在性 D-セリンと D-アミノ酸酸化酵素の役割 ---. *化学と生物*, 42: 426-428, 2004.
 9. K Oishi, M Ogawa, Y Oya, M Kawai: Whole-brain voxel-based correlation analysis between regional cerebral blood flow and intelligence quotient score in Parkinson's disease. *Eur Neurol*.52:151-155, 2004.
 10. Y Ohashi, Y Hasegawa, K Murayama, M Ogawa, T Hasegawa, M Kawai, N Sakata, K Yoshida, H Yarita, K Imai, I Kumagai, K Murakami, H Hasegawa, S Noguchi, I Nonaka, S Yamaguchi, I Nishino: A new diagnostic test for VLCAD deficiency using. *Neurology* 62:2209-2213, 2004.
 11. 山本敏之, 藤原由貴, 横田真知子, 中村治雅, 清水宏, 片岸美帆, 尾方克久, 竹嶋光代, 山村隆, 川井充: 多発性硬化症の interferon- β 1b 治療導入におけるクリティカルパスの検討. *神経治療学* 21:175-181, 2004.
 12. 山本敏之, 菊池猛, 永江順子, 尾方克久, 小川雅文, 川井充: ディスプロソディを主徴とし環境音失認をともなった右側頭葉血流低下の 1 例. *臨床神経* 44:28-33, 2004.
 13. 大矢寧, 小川雅文, 川井充: Proportional assist ventilation をもちいた、呼吸筋力低下患者の呼吸器系の elastance と resistance の測定. *臨床神経* 44:268-273, 2004.
 14. 山本敏之, 大矢寧, 五十嵐修, 豊田千純子, 小川雅文, 川井充: 上眼瞼部に腫瘤の触知した慢性脱髄性多発ニューロパチーにおける多発性末梢神経腫脹の MRI、電気生理学的検査による検討. *臨床神経* 44:286-290, 2004.
 15. 山本敏之, 尾方克久, 片岸美帆, 清水宏, 小川雅文, 山村隆, 川井充: 日本語版 Multiple Sclerosis Quality of Life-54 の信頼性の検討. *臨床神経* 44:417-421, 2004.
 16. 豊田千純子, 小川雅文, 大矢寧, 川井充: 筋疾患における呼吸機能スクリーニングとしての最大発生時間. *脳と神経* 56:873-876, 2004.
 17. 村上泰生, 大矢寧, 小川雅文, 川井充: 筋強直性ジストロフィーでの息こらえによる息苦しきの検討. *臨床神経* 45:117-120, 2005.
- (2) 著書
1. 西川 徹: 6. 神経化学から. (風祭元, 山下格 編). *心の科学セレクション 統合失調症*. pp.541-542. 日本評論社, 東京, 2005.
 2. 伊藤 卓, 西川 徹: 3. 最初期遺伝子と核内情報伝達系. *新規抗精神病薬のすべ*

て(加藤進昌, 上島国利, 小山司編), 先端医学社, 東京, pp270-275, 2004.

3. 大島一成. 西川 徹: 18. 精神科領域の救急. 第7章経験すべき症状・病態. ①緊急を要する疾患・病態. 臨床研修実践マニュアル(奈良信雄編), 南江堂, 東京, pp328-331, 2004.
4. 西川 徹: 5. 統合失調症. 第8章 Common Diseases. ①精神疾患・心身医学. 臨床研修実践マニュアル(奈良信雄編), 南江堂, 東京, pp541-542, 2004.
5. 西川 徹: Schizophrenia の分子病態—内在性D-セリンおよび発達依存的発現制御を受ける遺伝子の意義—. 星和書店, 東京, 2004.

(3) 総説

1. 古田 光, 西川 徹: 統合失調症 標準治療と最新治療—メリットとデメリット法. Clin Neurosci 23: 106-107, 2005.
2. 嶋津 奈, 西川 徹: モノアミン障害・アンフェタミンモデル 統合失調症の仮説とそのモデル検. 分子精神医学 5: 58-63, 2005.
3. 西川 徹: 統合失調症の分子薬理学的解析—ドーパミン受容体および NMDA 受容体作用薬を用いたアプローチ—. 特集 1 統合失調症: 分子から治療まで. 脳 21 8: 9-15, 2005.
4. 西川 徹: Schizophrenia の分子病態—内在性D-セリンおよび発達依存的発現制御を受ける遺伝子の意義—. 第1回 Schizophrenia 研究会. 臨床精神薬理 7: 87-112, 2004.
5. 西川 徹: 統合失調症のグルタミン酸仮説. 生体の科学 55: 544-545, 2004.
6. 西川 徹: mrt1 をめぐって 統合失調症の神経生物学. mrt1; Possible implication in the pathophysiology of schizophrenia. Schizophrenia Frontier 5: 18-24, 2004.
7. 西川 徹: Special Review 「脳内 D-セリ

ンの代謝と生理作用」. 細胞工学 23: 1180-1185, 2004.

(4) その他

1. 村岡新一郎, 梶井 靖, 山本直樹, 海野麻未, 柏 淳, 伊藤 卓, 金子雄二郎, 西川 徹. 統合失調症の発症に関与する遺伝子の発達薬理学的研究. 精神薬療研究年報 36: 49-52, 2004.
2. 内匠 透, 藤井律子, 吉村 淳, 井上 浄, 渡辺康仁, 漆戸智恵, 岡部繁男, 西川 徹. 抗精神病薬標的分子としての RNA 結合蛋白の機能解析. 精神薬療研究年報 36: 90-94, 2004.
3. 新井 誠, 糸川昌成, 山田和男, 豊田倫子, 羽賀誠一, 氏家 寛, 曾良一郎, 池田和彦, 吉川武男. 統合失調症における神経細胞接着分子関連遺伝子の解析. 精神薬療研究年報 36: 100-113, 2004.

2. 学会発表

(1) 特別講演・シンポジウム

1. 西川 徹: 統合失調症の病態研究の現状と展望. 「脳疾患の病態研究と治療法開発の方向性」. 先端脳・脳科学総合研究センター病因遺伝子研究グループ合同ワークショップ, 和光, 4.3, 2004.
2. 西川 徹: 統合失調症の分子病態と新しい治療法開発. 第100回日本精神神経学会総会. 札幌, 5.22, 2004.
3. 西川 徹, 山本直樹, 柏 淳, 櫻井新一郎, 嶋津 奈, 谷口 豪, 金子雄一郎, 竹林裕直: 幻覚・妄想状態の発症・再発モデルとしての長期持続性行動感作現象の分子機構. 「シナプス可塑性の分子機構研究と精神神経疾患研究の接点を探る」. シナプス可塑性研究会, 5.28, 2004.
4. 西川 徹: グルタミン酸—D-セリンシステムと統合失調症. 神経科学会議. 宮崎, 6.12, 2004.
5. 西川 徹, 山本直樹, 海野麻未, 櫻井新一郎, 嶋津 奈, 谷口 豪, 石井澄和, 岩間

- 久行: D-セリンと統合失調症. 第 47 回日本神経化学学会大会. 大阪, 9.23, 2004.
6. 西川 徹: 動物モデルによる統合失調症関連遺伝子への発達薬理学的アプローチ. 第 49 回日本人類遺伝学会大会, 第 4 回東アジア人類遺伝学会連合会大会. 東京, 10.13, 2004.
 7. 西川 徹: 統合失調症の分子薬理学的解析: ドーパミン受容体および NMDA 受容体作用薬を用いたアプローチ. 「統合失調症: 分子から治療まで」. 第 17 回ブレインサイエンスシリーズ. 千里, 10.19, 2004.
 8. 西川 徹: メトアンフェタミンに発達依存応答を示す遺伝子 *mrt1* と統合失調症の逆耐性モデル. 第 27 回日本分子生物学会年会. 神戸, 12.8, 2004.
 9. 西川 徹: 分子生物 — 統合失調症. 東京大学医学部 M1 基礎統合講義 精神疾患の基礎医学. 東京, 2.8, 2005.
 10. Nishikawa T: Glutamate dysregulation in schizophrenia. *Recent Progress in Basic and Clinical Research of Neuropsychiatric Diseases*, Seoul, 2.25, 2005.
 11. 西川 徹: 「統合失調症治療と NMDA 受容体グリシン結合部位作動薬」, 第 78 回日本薬理学会年会, 横浜, 3.24, 2005.
 12. 川井充: 筋生検を本当に役にたつ検査にするために. 第 13 回日本神経学会中国四国地方会生涯教育講演会, 岡山, 6.19, 2004.
 13. 川井充: 筋生検が本当に役にたつために. 第 4 回奈良神経内科セミナー, 奈良, 20.2, 2004.
 14. 川井充: 筋ジストロフィーの治療に関する最近の研究の進歩. 第 19 回筋ジストロフィー対策埼玉研修会, 埼玉, 2.6, 2005.
- (2) 国際学会
1. Sakurai S, Ishii S, Umino A, Yamamoto N, Nishikawa T: Effects of Psychotomimetic And Antipsychotic Agents On Neocortical And Striatal Concentration Of Various Free Amino Acids In The Rat. *The International Journal Of Neuropsychopharmacology*, XXIV, CINP Congress. Paris, 6.23, 2004
 2. Yamamoto N, Shimazu D, Umino A, Sakurai S, Taniguchi G, Nishikawa T: Regulation Of Endogenous D-Serin In The Cerebral Neocortex. *The International Journal Of Neuropsychopharmacology*, XXIV, CINP Congress. Paris, 6.23, 2004
 3. Nishikawa T, Kajii Y, Muraoka S, Fujiyama K, Hiraoka S, Umino A, Kashiwa A, Ito T, Kaneko Y, Yamamoto N: MRT1: Possible Involvement In The Molecular Basis Of Behavioral Sensitization, A Model For Stimulant-Induced Psychosis. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, XXIV, CINP Congress. Paris, 6.23, 2004
 4. Sakurai S, Ishii S, Umino A, Shimazu D, Yamamoto N, Nishikawa T: Effects of psychotropic agents on the net contents of various amino acids in the rat neocortex and striatum. *Society for Neuroscience 34th Annual Meeting*. San Diego, 10.24, 2004.
 5. Ito T, Hiraoka S, Kashiwa A, Kaneko Y, Kurumaji A, Nishikawa T: Developmentally regulated induction of CCN1(CYR61) by NMDA antagonists in the rat neocortex. *Society for Neuroscience 34th Annual Meeting*. San Diego, 10.27, 2004.
 6. Fukui K. Astroglial D-amino acid oxidase is the key enzyme to metabolize extracellular D-serine, a neuromodulator of NMDA receptor. *韓国生化学・分子生物学会第 8 回 Bomun Conference*, 慶州, 2005 年 1 月
 7. M Kawai: Clinical Management of Myotonic Dystrophy. *The 4th Annual Scientific Meeting of Asian & Oceanian Myology Center Kaohsiung, Taiwan*, March 3rd-4th, 2005.

(3) 国内学会

一般学会

1. 宮崎 美里, 大島 一成, 車地 暁生, 西川 徹. 大学病院精神科開放病棟における抑うつ状態を呈した患者に対する小集団精神療法 - 障害受容の初期過程における攻撃性の表現とグループのコンティン機能について -. 第 21 回日本集団精神療法学会大会, 静岡, 2004 年 3 月.
2. 花村誠一, 大島一成, 安宅勝弘, 行実知昭, 岩脇 淳, 西川 徹. 統合失調症疑診群および確診群における基底症状, 陽性症状. 陰性症状間の相関. 第 100 回日本精神神経学会総会, 札幌, 2004 年 5 月.
3. 行実知昭, 花村誠一, 中村元昭, 岩間久行, 松田博史, 大島一成, 新垣 浩, 西川 徹. 統合失調症の陰性症状と脳血流の関連. 第 100 回日本精神神経学会総会, 札幌, 2004 年 5 月.
4. 竹内 崇, 古田 光, 平沢俊行, 行実知昭, 熱田英範, 武田充弘, 新垣 浩, 本橋伸高, 西川 徹. せん妄に対する非定型抗精神病薬の使用経験. 第 100 回日本精神神経学会総会, 札幌, 2004 年 5 月.
5. 平沢俊行, 新垣 浩, 車地暁生, 本橋伸高, 西川 徹. 遷延性のうつ状態に donepezil, 1-dopa が有効であった 1 例. 東京精神医学会, 第 71 回学術集会, 東京, 2004 年 7 月.
6. 櫻井新一郎, 石井澄和, 海野麻未, 嶋津奈, 山本直樹, 西川 徹. 統合失調症様異常発現薬および抗精神病薬のラット脳内遊離アミノ酸含有量に対する影響. 第 34 回日本神経精神薬理学会, 東京, 2004 年 7 月.
7. 青木美佳, 山田和男, 茂野佳美, Joanne Meerabux, 岩本和也, 大羽尚子, 鷹雄 瞳, 豊田倫子, 深澤正幸, 中谷紀章, 西村幸子, 関健二郎, Brian Dean, 加藤忠史, 糸原重美, 西川 徹, 吉川武男. ネットリン G1 遺伝子およびネットリン G2 遺伝子の統合失調症発症に及ぼす影響. 第 34 回日本神経精神薬理学会, 東京, 2004 年 7 月.
8. 車地暁生, 伊藤 卓, 石井澄和, 西川 徹. 不安惹起物質 (FG7142) により生後発達依存性に発現するマウス脳内遺伝子に関する研究. 第 34 回日本神経精神薬理学会, 東京, 2004 年 7 月.
9. 堀川英起, 田口裕佳子, 竹内崇, 大島一成, 西川 徹, 宮本めぐみ. 利用者から見たデイケア、スタッフからみたデイケア - 大学病院デイケアにおける利用者およびスタッフの視点の比較 -. 日本デイケア学会第 9 回年次大会, 東京, 2004 年 9 月.
10. 谷口 豪, 山本直樹, 土田英人, 海野麻未, 嶋津 奈, 櫻井新一郎, 西川 徹. ラット大脳皮質において D-セリンによって発現が誘導される遺伝子 *dsr-2* の研究. 第 47 回日本神経化学学会大会, 大阪, 2004 年 9 月.
11. 嶋津 奈, 山本直樹, 海野麻未, 櫻井新一郎, 西川 徹. D-セリン制御分子 *dsm-1* の発現クローニング. 第 47 回日本神経化学学会大会, 大阪, 2004 年 9 月.
12. Kurumaji A, Ito T, Ishii S, Nishikawa T. Effects of anxiogenic drugs on BTG2 mRNA in the mouse brain. 第 47 回日本神経化学学会大会, 大阪, 2004 年 9 月.
13. Fukui K. Functional roles and pathophysiology of brain D-amino acid oxidase. *Neuro2004*, 大阪, 2004 年 9 月.
14. Kawazoe T, Yorita K, Ono K, Iwana S, Park HW, Tomita Y, Fukui K. Purification and characterization of recombinant human D-amino acid oxidase. 第 77 回日本生化学学会大会, 横浜, 2004 年 10 月.
15. 山本直樹, 谷口豪, 海野麻未, 石井澄和, 櫻井新一郎, 嶋津奈, 竹内崇, 竹林裕直, 柏 淳, 新垣浩, 車地暁生, 西川徹. 脳の D-セリンシステムを標的とした統合失

- 調症の新規薬物治療法開発に関する研究.
第 37 回精神神経系薬物治療研究報告会,
2004 年 12 月.
16. 磯部建夫, 尾方克久, 小川雅文, 大矢寧,
川井充: 約 15 年の経過で緩徐進行性の筋
位筋筋力低下をきたした、C 型慢性肝炎
に合併した多発性筋炎の 68 歳男性例. 第
52 回 Neuromuscular Conference, 東京,
2004 年 4 月 10 日
 17. 葛目大輔, 山本敏之, 大矢寧, 小川雅文,
川井充: Machado-Joseph 病 (MJD) での
耐糖能異常の検討. 第 45 回日本神経学会
総会, 東京, 2004 年 5 月 11 日
 18. 片岸美帆, 山本敏之, 尾方克久, 大矢寧,
小川雅文, 川井充: 筋萎縮性側索硬化症
(ALS) 患者における呼吸機能の経時変
化. 第 45 回日本神経学会総会, 東京, 2004
年 5 月 11 日
 19. 磯部建夫, 山本敏之, 尾方克久, 大矢寧,
小川雅文, 川井充: 神経疾患における姿
勢による呼吸機能の変動. 第 45 回日本神
経学会総会, 東京, 2004 年 5 月 11 日
 20. 中村治雅, 片岸美帆, 清水宏, 磯部建夫,
白藤俊彦, 葛目大輔, 山本敏之, 尾方克久,
大矢寧, 小川雅文, 川井充: 呼吸筋力計を
用いた神経筋疾患患者の呼吸機能評価.
第 45 回日本神経学会総会, 東京, 2004 年
5 月 11 日
 21. 小川雅文, 山本敏之, 尾方克久, 大矢寧,
川井充: パーキンソン病の脳血流低下は
幻覚の危険因子か?. 第 45 回日本神経学
会総会, 東京, 2004 年 5 月 11 日
 22. 尾方克久, 小川雅文, 中村治雅, 片岸美帆,
白藤俊彦, 川井充: 筋萎縮性側索硬化症
における効用値 QOL 測定の妥当性. 第 45
回日本神経学会総会, 東京, 2004 年 5 月 11
日
 23. 清水宏, 山本敏之, 尾方克久, 大矢寧, 小
川雅文, 川井充: 骨格筋 CT による FSHD
及び MyD の筋萎縮の定量的解析. 第 45
回日本神経学会総会, 東京, 2004 年 5 月 11
日
 24. 大矢寧, 小川雅文, 川井充, 西野一三: 縁
取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV,
Nonaka) の筋罹患分布と GNE 遺伝子異
常. 第 45 回日本神経学会総会, 東京, 2004
年 5 月 11 日
 25. 大矢寧, 白藤俊彦, 尾方克久, 小川雅文,
川井充, 仲間秀幸, 大槻泰介: 生検で確認
された多発性硬化症の初回補発作例の臨
床画像病理の対応. 第 45 回日本神経病理
学会総会, 群馬, 2004 年 5 月 26-28 日
 26. 大矢寧, 中村治雅, 尾方克久, 小川雅文,
川井充, 坂元綾子, 有馬邦正: 右上肢の運
動障害が目立ち、姿勢反射障害が目立た
ずに、皮質基底核変性症との鑑別が問題
になった、進行性核上性麻痺 (PSP) の
一例. 第 45 回日本神経病理学会総会, 群
馬, 2004 年 5 月 26-28 日
 27. 清水宏, 大矢寧, 小川雅文, 川井充, 大出
貴士, 有馬邦正: 交換神経節に Lewy 小体
を認めた他系統萎縮症の 70 歳男性例. 第
169 回日本神経学会関東地方会, 東京,
2004 年 6 月 5 日
 28. 安東範明, 川井充: 筋ジストロフィーに
おける脊柱側弯矯正手術の満足度. 第 41
回リハビリテーション医学会学術集会, 東京,
2004 年 6 月 4 日
 29. 村上善勇, 中村治雅, 大矢寧, 川井充: 強
直脊椎と左優位の下肢筋萎縮を呈した 28
歳男性例. 第 53 回 Neuromuscular
Conference, 東京, 2004 年 7 月 31 日
 30. 白藤俊彦, 鈴木幹也, 尾方克久, 大矢寧,
小川雅文, 村田美穂, 川井充: MRI で脳梁
と両側前頭葉内側面に連続した病変を認
めた多発性硬化症の 26 歳女性例. 第 170
回日本神経学会関東地方会, 東京, 2004
年 9 月 4 日
 31. 宮武聡子, 大友学, 谷田部可奈, 岸林潤,
布施滋, 川井充: 進行性に両下肢筋力低
下を来たした 59 歳男性例. 第 24 回 Spinal
Cord Club, 東京, 2004 年 11 月 5 日

32. 宮武聡子, 大友学, 谷田部可奈, 岸林潤, 布施滋, 川井充, 石原傳幸, 野中征哉: 進行性の両下肢筋力低下を来たし、錐体路徴候、腱反射消失、深部覚障害、及び筋緊張低下を認めた 59 歳男性例. 第 54 回 Neuromuscular Conference, 東京, 2004 年 12 月 25 日
33. 中村治雅, 鈴木幹也, 尾方克久, 大矢寧, 小川雅文, 川井充: 小殿筋、腓腹筋・ヒラメ筋に高度の脂肪浸潤がみられ、一部に排尿障害も合併するミオパチーの家系. 第 54 回 Neuromuscular Conference, 東京, 2004 年 12 月 25 日
34. 宮武聡子, 谷田部可奈, 川井充, 石原傳幸, 野中征哉: ビタミン B12 の組織内欠乏によるミオパチーを合併した亜急性連合性変性症の 59 歳男性例. 第 172 回日本神経学会関東地方会, 東京, 2005 年 3 月 5 日
35. 大友学, 布施滋, 尾方克久, 谷田部可奈, 宮武聡子, 川井充: 左上肢の進行性の筋萎縮と筋力低下で発症し、呼吸全を伴って NPPV を装着した 75 歳男性例. 第 25 回 Spinal Cord Club, 東京, 2005 年 3 月 25 日

その他

1. 西川 徹, 車地暁生, 伊藤 卓, 海野麻未, 柏 淳, 金子雄二郎. ストレスに年齢依存的応答を示す遺伝子. 科学技術振興調整費「ストレス性脳機能障害とその修復課程の分子機構解明および治療法の開発」研究班平成 15 年度研究報告会, 東京, 2004 年 1 月.
2. 西川 徹, 柏 淳, 伊藤 卓, 金子雄二郎, 山本直樹, 石井澄和, 海野麻未. 覚せい剤・麻薬によるラット大脳新皮質の発達依存的遺伝子応答およびアミノ酸の変化. 厚生労働科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)「規制薬物の依存及び神経毒性の発現に係わる仕組みの分子生物学的解明に関する研究」班平成 15 年

度研究報告会, 普及啓発事業, 東京, 2004 年 1 月.

3. 山本直樹, 櫻井新一郎, 嶋津 奈, 谷口 豪, 竹林裕直, 石井澄和, 海野麻未, 兼松宗太郎, 金子雄二郎, 竹内崇, 柏淳, 車地暁生, 西川徹. 脳内D-セリンシステムの分子機構とその統合失調症の病態および治療法開発における意義に関する研究. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「精神疾患の分子病態解明による新しい治療・予防法の開発に関する研究」班平成 16 年度研究成果報告会, 東京, 2004 年 12 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
本分担課題と直接関係するものはない
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記すべきことなし

II. 分担研究報告

D-セリンシステムの分子機構と その高次脳機能障害における病態の解明

分担研究者 西川 徹

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科精神行動医科学・教授

研究協力者 山本直樹, 谷口豪, 海野麻未, 石井澄和, 嶋津奈, 竹林裕直, 柏淳

研究要旨 本研究では、高次脳機能障害の新しい治療法の開発をめざし、その分子病態を明らかにすることを目的としている。このため、NMDA 型グルタミン酸受容体が高次脳機能の発達・発現・制御等に重要な役割を果たすことや、主任研究者らが発見した脳の内在性 D-セリンが NMDA 受容体の活性化に必須の内在性コ・アゴニストと考えられ精神神経疾患の症状を改善すること等の所見に基づき、内在性 D-セリンの代謝・機能と高次脳機能障害における異常の分子機構を解明する。初年度は、D-セリンシステム関連分子に関する研究として、主任研究者らがクローニングした、D-セリン選択的に応答を示す遺伝子 *dsr-2* (D-serine responsive transcript-2) と、D-セリンの細胞内蓄積を減少させる *dsm-1* (D-serine responsive transcript-2) の解析を中心に進めた。*dsr-2* は、1)ゲノム上、*neurexin-3alpha* (*nrxn3*) の一つの intron 内の反対鎖側に位置すること、2)脳選択的で D-セリンおよび NMDA 受容体 R2B サブユニットと酷似した分布と発達に伴う分布変化を示す点が *nrxn3* と異なること、などが明らかになり、D-セリンや NMDA 受容体の調節に関与することが示唆された。また、*dsm-1* は、細胞内の内在性 D-セリン濃度を減少させる作用もあること、D-セリンへの効果が他のアミノ酸に比べて最も強いこと、ほ乳類細胞内に強制発現させると主に細胞質に認められることなどがわかり、D-セリンの細胞小器官への移行や代謝に関与する可能性が推測された。

A. 研究目的

脳血管障害、神経変性疾患、神経発達障害、その他の神経疾患では、記憶・学習障害、失語、失行、小脳性失調をはじめ、様々な高次脳機能障害が引き起こされる。これらの中には、治療薬が存在せず十分な回復を望めない症状も多く、膨大な数にのぼる患者および家族の苦痛はもちろん、社会的損失は計り知れず、新たな治療法の確立が急務となっている。しかし、脳画像技術、神経生理学的・神経心理学的検査等を用いた病態解析および診断法が急速な進歩を遂げつつあるのに対して、新規薬物療法の開発に結びつく分子病態に関する研究は、世界的に見ても

遅れており、今後強力に推進する必要がある。

申請者らは、NMDA 型グルタミン酸受容体のコ・アゴニスト（前項 6. の説明を参照）として作用する D-セリンが、脳の内在性物質であって、前頭葉や小脳に関係する統合的機能や認知機能の異常等の高次脳機能障害を改善することを見出した。また、D-セリンは、1)脳内で合成・放出・取り込み・分解などのプロセスをもつこと、2)広汎な高次脳機能障害を来す非ケトーシス型高グリシン血症患者の死後脳や、3)excitotoxin により選択的に神経細胞を破壊した脳局所で著しく減少すること、などを明らかにした。さらに D-セリンは、

グリア細胞と神経細胞の双方に存在し、NMDA 受容体を介して長期増強、シナプスの構築・再構築、神経細胞の移動などに関与することが知られている。これらの所見は脳の D-セリンが構築するシステムが、高次脳機能の発達・発現・制御・障害修復などにおいて重要な役割を果たすことを示唆している。そこで本研究では、D-セリンシステムとその高次脳機能障害における病態を分子レベルで解明し、D-セリンシグナルを調節する高次脳機能障害の新たな治療法の開発を目指す。

初年度は、D-セリンシステム関連分子に関する研究として、本研究の開始以前に主任研究者らがクローニングした、D-セリン選択的に応答を示す遺伝子 *dsr-2* (D-serine responsive transcript-2) と、D-セリンの細胞内蓄積を減少させる *dsm-1* (D-serine responsive transcript-2) の解析を中心に進めた。

B. 研究方法

本年度の研究は、東京医科歯科大学の実験動物委員会の承認を得た上、ガイドラインを遵守して行った。

1. 対象および試薬

実験には、1) 8 日齢および 50 日齢の Wistar 系雄性ラット、2) アフリカツメガエル卵母細胞、3) COS 株化培養細胞、4) PC12 株化培養細胞および 4) 生後 1-2 日齢ラット大脳皮質より調整した初代培養の I 型ならびに II 型アストロサイト等を用いた。アフリカツメガエル卵母細胞への D-セリン蓄積を観察する一部の実験では、 $[^3\text{H}]$ D-serine (Moravek Biochemicals Inc.) を使った。

2. Northern blotting および Southern blotting

Northern blotting は、ラット大脳新皮質から抽出した poly(A)⁺ および poly(A)⁻ RNA をアガロースゲル電気泳動の後、ナイロンメンブレンに転写し、*dsr-2* に対する $[^{32}\text{P}]$ UTP で標識したアンチセンス RNA プローブを合成してハイブリダイゼーションさせた。Southern blotting は、ラット大脳新皮質から抽出した genomic DNA を、*Bam*HI、*Eco*RI、*Hind*III の 3 種類の制限酵素で

切断後アガロースゲル電気泳動にもちいた。 $[^{32}\text{P}]$ dCTP で標識した cDNA プローブによりハイブリダイゼーションをおこなった。

3. 半定量 RT-PCR

dsr-2 および *dsm-1* の、種々の組織や細胞における発現と、それらの発達あるいは分化に伴う変化を比較するため、半定量 RT-PCR を行った。さらに一部の解析では、より高い定量性を期すために、同一チューブ内において内部標準となるプライマー (28S ribosomal RNA, rRNA) と同時に増幅することにより、サンプルの個体差およびサンプル間のばらつきをコントロールした。電気泳動後に 0.5 ug/ml ethidium bromide で染色した 1xTAE (40 mM Tris acetate, 1 mM EDTA) 含有 3% NuSieve 3:1 アガロースゲル (Cambrex) における個々のバンドの UV 照射時のシグナル強度を蛍光イメージアナライザー (Lumi-Imager, Roche) にて解析した。

4. *dsr-2* 遺伝子の構造解析

Southern blotting にもちいた *dsr-2* cDNA プローブによりラットジェノミック PAC (P1-derived artificial chromosome) ライブラリーをハイブリダイゼーション法にてスクリーニングし、陽性クローンを単離した。ショットガンベクター pUC118 にサブクローニングの後、ショットガン・シーケンスにて決定した配列をアセンブリソフトをもちいて *dsr-2* 遺伝子を含む pPAC4 クローンのインサート全長の一次構造を決定した。

5. アフリカツメガエル卵母細胞へのアミノ酸蓄積の観察と Dsm-1 蛋白の発現

D-セリンおよびその他アミノ酸のアフリカツメガエル卵母細胞への蓄積は、メディウム中に外来性の各種アミノ酸を添加した条件と添加しない条件で 1 時間観察した。また、D-セリンの蓄積は、 $[^3\text{H}]$ D-serine を用いて放射活性を測定する方法と、非標識体を HPLC (高速液体クロマトグラフィー) で分離・定量する方法で解析した。以上のアミノ酸蓄積が、卵母細胞内に Dsm-1 蛋白を発現させることによってどのように変化するかを調べるため、ラット大脳新皮質から

dsm-1 の cRNA を *in vitro* で合成して卵母細胞に微量注入 (50 nl) し、2 日後にアミノ酸の蓄積実験を行った。対照群としては、溶媒の RNase-free H₂O または上記 cRNA の antisense strand を注入した。

6. In vivo ダイアリシス

前頭葉の細胞外液中の D-セリンおよび他のアミノ酸は、マイクロダイアリシス法により測定した。すなわち、ペントバルビタール (40mg/kg、腹腔内注射 (i.p.)) 麻酔下で、ステレオタキシーを使い、透析プローブ (エイコム社製 (A-I-4-03)、透析膜部位の長さが 3mm のもの) を内側前頭葉皮質 (AP +3.2mm, RV -0.6mm, VL+5.2mm) に埋め込んだ。薬物投与実験は、手術 2 日後に行い、プローブ内への Ringer 液 (NaCl, 147 mM; KCl 4 mM; CaCl₂, 1.3 mM; pH 7.3) の持続的灌流を開始した (流速 2 μ l/min)。脳内の細胞外液中の低分子を含む灌流液は、マイクロフラクションコレクターにより 0.8ml バイアル内へ蓄積して 20 分毎に回収し、-80°C で保存した。

7. 高速液体クロマトグラフィーを用いたアミノ酸の定量

各サンプル中の遊離型アミノ酸は、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC) によって測定した。凍結保存しておいたサンプルは、測定時に融解し、キラルアミノ酸の分離のため、Bos-L-Cys を加えて誘導体化した後、さらに蛍光測定用誘導体化のため OPA を添加した。前処理が終わったサンプル中のアミノ酸を、逆相カラム (Nova-PakC18 (300 \times 3.9mm, i.d, Waters, Japan)) で分離した後、蛍光検出器 (821-FPS spectrofluorometer (Jasco international CO. Ltd, Japan)) により、励起光波長 344nm、検出波長 433nm で定量した。

8. セリンヒドロキシメチル基転移酵素活性の測定

ラット肝臓ホモジネートを DL-[3-¹⁴C]セリン 1mM、ピリドキサルリン酸、テトラヒドロ葉酸存在下に、リン酸カリウムバッファー中でインキュベートし、生成した標識ヒドロキシメチルテトラヒドロ葉酸を検出した。

C. 研究結果

1. dsr-2 遺伝子の解析

dsr-2 遺伝子は、ラットゲノムにおいて *neurexin3alpha (nrn3)* 遺伝子の第 5 イントロン中の反対鎖にコードされ、マウスやヒトでもこの関係は共通である特徴が明らかとなった。dsr-2 mRNA は脳特異的に発現しており、脳内分布とその発達による変化は、D-セリン濃度や NMDA 受容体 R2B サブユニット mRNA と酷似していることがわかった。これに対して、*nrn3* は脳と精巣に選択的に発現していた。脳内の分布は小脳にも比較的多くの発現が見られることと、大脳新皮質および小脳における発現が生後 8 日齢と 50 日齢の間でほとんど変化しない点、dsr-2 と異なっていた。小脳における異なる部分があることがわかった。

2. dsm-1 遺伝子の解析

dsm-1 は脳と肝臓で選択的に転写され、脳内の発現は、大脳新皮質、海馬、線条体、前脳部辺縁系領域等で多く、中脳では中等度、小脳や橋・延髄では少ない、D-セリン濃度の分布と同様の傾向を示した。また、アフリカツメガエル卵母細胞に Dsm-1 蛋白を発現させると、培養液中に加えた外来性の D-セリンの蓄積だけでなく、卵母細胞内の内在性 D-セリンも減少することが観察された。一方、ほ乳類細胞 COS に強制発現した標識 Dsm-1 蛋白は、クラスリンと類似して、核周囲を中心とした細胞質に分布していた。

3. 脳の D-セリン遊離におけるグリア細胞の役割

In vivo マイクロダイアリシス法により、選択的・可逆的グリア毒であるフルオロクエン酸を還流したラットの内側前頭葉皮質においては、細胞外液中の D-セリン濃度とグルタミン濃度がそれぞれ 20-30%程度と 80%以上減少し、グリシン、タウリン、L-セリンは逆に増加した。

4. D-サイクロセリンの脳内 D-セリン代謝に及ぼす影響

NMDA 受容体機能を促進することにより、小脳失調を改善する効果を発揮する D-サイクロセリンは、ラットへの全身投与により大脳新皮質内の組織中および細胞外液中の D-セリン濃度を