

Z00500789A

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 17 年度)

主任研究者 西川 徹

平成 18 (2006) 年 3 月

# 総括研究報告書（平成 17 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用量依存性試験

川井 充 . . . . . 26

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 . . . . . 35

V. 平成 17 年度分担研究者氏名一覧 . . . . . 183

# 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。

第二年度は、主任研究者および各分担研究者が初年度に開始した相互に関連する研究が発展し多くの新知見が得られた。脳の内在性 D-セリンの代謝・機能の分子機構の研究においては、関連候補遺伝子 *dsm-1* が D-セリンの細胞外放出調節に関与することが示唆されるとともに、D-セリンの分解活性をもつ D-アミノ酸酸化酵素の結晶化と機能解析が進展した。また、ラット大脳新皮質より、D-セリンに立体選択的な応答性を示す新たな候補遺伝子 *dsr-3* が検出され、成熟期には小脳より大脳新皮質に多く発現し、肝臓ではほとんど発現が見られない点で D-セリンと類似した分布を示すことがわかった。

D-セリンの病態に関する研究では、神経細胞またはグリア細胞に選択的な毒素を用いた実験から、しばしば高次脳機能障害の原因となる大脳皮質局所の神経細胞およびグリア細胞の損傷・変性に細胞外 D-セリンシグナルの低下が関与する可能性が示唆され、本研究で進めている、高次脳機能障害に対する D-サイクロセリンを用いた D-セリンシグナル増強療法の合理性が支持された。一方、過剰な D-セリンが D-アミノ酸酸化酵素の働きによりグリア細胞障害を引き起こす場合があることがわかり、D-セリンシグナル増強療法の用量設定に重要な参考データとなった。

高次脳機能の臨床治療研究としては、脊髄小脳変性症患者において、D-セリンが結合する部位の刺激による NMDA 受容体機能促進作用をもつ D-サイクロセリンの用量依存性試験（50 または 100mg/日）を二重盲検のクロスオーバー法で実施中である。目標の 20 名のうち、現在までに 17 名の患者の投与が進行中あるいは投与が終了して長期投与に移行している。

#### 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

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。

#### 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

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、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。

このため第二年度は、初年度に引き続き、*differential cloning* 法を用いて D-セリンの代謝・機能に関連する候補遺伝子を探索するとともに、初年度までにクローニング・解析を進めてきた、D-セリンの細胞内蓄積を減少させる *dsm-1* (D-serine responsive transcript-2) の産生蛋白の機能を検討した。D-セリン分解活性を示す D-アミノ酸酸化酵素の結晶化標品を用いて本酵素の活性調節や生理的意義に関する研究も行った。また、高次脳機能における D-セリンの病態の手がかりを得る目的で、神経細胞またはグリア細胞に選択的な作用をもつ毒素を用いて、いずれかの細胞が損傷を受けた脳局所における細胞外 D-セリン濃度の変化を調べた。一方、高次脳機能障害に対する D-セリンシグナル増強療法として、D-セリンの結合部位の刺激を通じて NMDA 受容体機能を促進する D-サイクロセリンを脊髄小脳変性症患者に投与する臨床試験を継続し、今年度は用量依存性の二重盲検クロスオーバー試験を中心に進めた。この治療法に関する基礎的研究では、過剰な D-セリンシグナルの細胞損傷の可能性の検討も続けた。

## 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 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、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)<sup>+</sup> および poly(A)<sup>-</sup> 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. DNA マイクロアレイおよび半定量的 real-time RT-PCR

D セリンに立体選択的応答を示す遺伝子（D-セリンによって発現が変化し、L-セリンには有意な影響を受けない遺伝子）の DNA マイクロアレイによる検索には、AFFYTMETRIX 社製 GeneChip の Rat Expression Array 230 を用いた。生後 8 日齢のラットに、D-セリン、L-セリンまたは生理的食塩水を腹腔内注射した (9mmol/kg) 3 時間後に大脳新皮質を取り出し、全 RNA を抽出した。5 匹のラットから得た全 RNA を一定量ずつプールして、GeneChip により遺伝子発現の差異を解析した。検出された D セリン選択的応答候補遺伝子の転写産物について、種々の

組織における発現と、それらの発達に伴う変化を比較するため、Right Cyclor システム（ロッシュ社製）を使って半定量 real-time RT-PCR を行った。

#### 4. アフリカツメガエル卵母細胞に前負荷した D-セリンの放出に対する Dsm-1 蛋白の影響の観察

アフリカツメガエル卵母細胞で Dsm-1 蛋白を発現させるため、dsm-1 cDNA のオープンリーディングフレームの部分、pBScMxt ベクターに組み込んで cRNA を合成し、卵母細胞に注入した。対照としては、卵母細胞に水またはアンチセンス cRNA を注入した。[3H]D-セリンの細胞外放出を検討する実験では、予め 1mM の [3H]D-セリン存在下で dsm-1 cRNA または水を注入した卵母細胞を 26°C、60 分間インキュベートし、[3H]D-セリンを細胞内に負荷した。これらの細胞を洗浄した後、D-セリンを含まないカエルリングル液中に卵母細胞を移し、26°C で、経時的に細胞内外の [3H]D-セリンを測定した。細胞外液中 [3H]D-セリンの増加と細胞内 [3H]D-セリンの減少の双方を観察することにより、[3H]D-セリンの放出を検討した。

#### 5. 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; CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mM; pH 7.3) の持続的灌流を開始した (流速 2  $\mu$ 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。

#### 6. 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。

#### 7. 内側前頭葉皮質神経細胞体の選択的破壊

50 日齢のラットに、神経細胞体の選択的破壊するキノリン酸 (240nmol/side) を、pentobarbital 麻酔下でステレオタキシーを用いて、両側の前頭葉皮質の内側部に局所注入した (AP +3.2mm, RV -0.6mm, VL+5.2mm)。対照群には、溶媒であるリン酸緩衝生理食塩水を注入した。この手術の 1 週間後に、pentobarbital 麻酔下で同じ部位に透析プローブを装着し (研究方法 6. の項を参照)、in vivo ダイアリシス法により、細胞外液中 D-セリン濃度を検討した。

#### (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

本研究では、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、さらに個体レベルに至る解析を行い、脳の発生・分化及び老化の過程や病態における D-セリンとその代謝酵素の生理的・病態生理学的意義の解明を目指す。

#### (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

20 名の歩行可能な脊髄小脳変性症患者を無作為に 1 日 50mg 投与群と 100mg 投与群のいずれかに割り付ける。てんかんや精神障害を有する患者は除外する。サイクロセリン以外の薬剤とリハビリテーションは変更しない。

投与量は朝夕食後に2分割する。2群とも偽薬とのクロスオーバー試験とする。クロスオーバーの間は最低11日間の休薬期間を設定する。薬剤の調剤は国立精神・神経センター武蔵病院薬剤部と国立病院機構東埼玉病院薬剤科が担当する。評価項目は国際運動失調評価尺度(ICARS)、Barthel 指数、機能的自立評価法、10m往復平地歩行時間、EQ-5D、VASによるQOL評価、自覚症状記録。主要評価項目はICARSとする。

研究計画は国立精神・神経センター武蔵地区倫理委員会および国立病院機構東埼玉病院倫理委員会の承認を得たものである。また被験者は説明文書を用いて説明を受け、十分な質問の機会を持ち、文書で同意する。研究に参加意思を表明したあといつでも参加を取りやめることができる。また個人情報保護される。

## 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. 新規D-セリン応答性遺伝子の検索

既知遺伝子でも、D-セリン選択的な応答を示すものが見出されたが、本研究ではD-セリンの代謝・機能に関連する未知の遺伝子を明らかにすることが目的であるため、ESTに限定して検索を進めた。この中から、D-セリン投与後には有意に発現が上昇するが、L-セリン投与では変化が認められず、生後8日齢においては、大脳新皮質と小脳に同程度の発現が見られるが、成熟期の生後50日齢になると小脳の発現が低下し、肝臓では殆ど発現していない転写産物が検出された。これを、dsr-3 (D-serine responsive transcript-3) と名付け、現在、全長のcDNAその他の詳細を解析中である。

#### 2. dsr-1 遺伝子産物の機能解析

dsr-1のcRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞では、水を注入した対照群と比較して、前負荷した<sup>3</sup>H]D-セリンの蓄積が減

少しており、昨年度までの検討結果が再現された。細胞内<sup>3</sup>H]D-セリン濃度の経時的変化を調べたところ、120分間インキュベーションしても水注入群では変化は認められなかったのに対して、cRNA注入群では、インキュベーション時間に伴って減少する傾向が続き、120分後には開始時に比して有意に減少することがわかった。また、培養液中の<sup>3</sup>H]D-セリン濃度は、30分、60分、90分のいずれのインキュベーション時間においてもcRNA注入群の方が有意に高かった。

#### 3. 前頭葉皮質におけるキノリン酸局所注入後の細胞外D-セリン濃度の変化

キノリン酸注入により神経細胞体を選択的に破壊した、内側前頭葉皮質においては、リン酸緩衝生理食塩水を注入した偽出群に比べ、細胞外D-セリンの基礎的濃度が著明に低下し、対照群の30%程度になることがわかった。この減少率は、既に報告したキノリン酸注入後の内側前頭葉皮質の組織中D-セリンの減少率とほぼ同等であった。

#### 4. 前頭葉皮質におけるグリア細胞選択的毒素灌流の細胞外D-セリン濃度に与える影響

グリア細胞に存在するシスチン-グルタミン酸アンチポーターを選択的に阻害し、システインを含む抗酸化物質グルタチオンの蓄積を減少させるためにグリア傷害的に作用する、L- $\alpha$ -アミノアジピン酸を、ダイアリシチューブを通して内側前頭葉皮質に持続的に灌流すると、細胞外液中D-セリン濃度が軽度であるが有意に減少した。同時に測定した細胞外液中のL-グルタミン酸濃度は有意に上昇し、シスチン-グルタミン酸アンチポーターに作用していることが確認された。これらとは異なり、細胞外液中のL-セリンおよびグリシンの濃度は変化しなかった。

#### (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

昨年度までにラットC6細胞とmouse DAO遺伝子を恒常的に発現するC6細胞を用いて、

D-セリン添加実験を行い、DAO 遺伝子の発現量が高い細胞では、細胞外 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観察した。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たが、この細胞死は DAO の阻害剤である安息香酸とともに、フェノチアジン系を代表する向精神薬であるクロルプロマジンの添加により抑制された。

そこでヒト DAO 精製酵素標品を用いてクロルプロマジンによる酵素阻害効果の検討を行った。解析に用いる酵素タンパク質は、ヒト DAO の cDNA を発現ベクターに組み込み大腸菌で発現させた後、熱処理と二段階のカラムクロマトグラフィを用いて精製したもので、D-セリン等の中性アミノ酸に対する  $K_m$  値、阻害剤である安息香酸ナトリウムに対する  $K_i$  値はブタ DAO のパラメータとほぼ同等であった。クロルプロマジンを酵素溶液に加えて、酸素電極にて酵素活性の阻害、また蛍光・吸光を用いた光学的観測手法にて水溶液中における酵素分子の状態変化の有無等を観察し、ヒト DAO に対する影響を調べた。その結果、活性測定において、クロルプロマジンがヒト DAO に対して、阻害効果を有することを見出した。

### (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

現在 17 名の患者が登録されサイクロセリンの投与を終了あるいは投与中である(表)。キーオープンして効果を解析するためにはさらに 3 名の患者を登録し、投与を終了する必要がある。

表 サイクロセリン用量依存性試験登録患者

症例	年齢	性	病型
1	56	M	OPCA
2	77	F	OPCA
3	62	M	OPCA
4	69	F	CCA

5	53	F	OPCA
6	59	F	SCA6
7	35	M	CCA
8	67	M	CCA
9	75	M	OPCA
10	52	F	?
11	61	F	OPCA
12	65	M	OPCA
13	44	M	MJD
14	39	M	MJD
15	57	M	MJD
16	56	F	MJD
17	68	M	MJD

OPCA オリーブ橋小脳変性症

MJD Machado-Joseph 病

CCA 小脳皮質変性症

追加：長期投与試験へ移行した症例の経過報告

ダブルブライント投与が終了した症例のうち希望があった 8 例で一日 50mg 二分割の長期投与に移行した。3 例は通院が困難であるなどの理由でドロップアウトした。CCA?女 69 歳、SCA6 女 59 歳、OPCA 男 75 歳、CCA? 男 35 歳、MSA 男 56 歳の 5 例で一年間の投与をおこなった。可能なかぎり ICARS で 3 ヶ月ごとに評価した。すべての例で一ヶ月では ICARS の得点はあまりかわらず、少なくとも効果のあった例がすぐに効果消失することはないとおもわれた。MSA の 56 歳症例ではパーキンソニズムや自律神経症状の悪化もあり ADL や ICARS の得点は低下した。CCA 男 35 歳と MSA 男 75 歳の症例は比較的 ADL が一年後も保たれており ICARS の得点も変化があまりなかった。これは原病の進行が遅いためかサイクロセリンが少しでも効果があったのか判定は困難であるが長期でも有効なことがある可能性が考えられた。採血等で副作用は認められず、有害事象のため中止した例はなかった。



## 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

今年度は、ラット大脳新皮質から、新たに D-セリンに立体選択的に応答する遺伝子 *dsr-3* が見出された。また、主任研究者が D-セリンのアフリカツメガエル卵母細胞内への蓄積を抑制する遺伝子としてクローニングした *dsm-1* が、卵母細胞に負荷した D-セリン放出を促進することが示唆された。一方、神経細胞やグリア細胞が傷害を受けた場合に細胞外液中 D-セリン濃度が変化することが明らかになった。

*dsr-3* mRNA の基礎的発現は、成熟期において脳に多く、脳内では前脳部優位であり、肝臓に少ない特徴があった。さらに小脳では、幼若期の方が成熟期より発現レベルが高いことがわかった。これらの発現分布と生後発達に伴う変化は、D-セリンおよび NMDA 受容体 R2B サブユニットと比較的類似していることから、*dsr-3* や産生蛋白は、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可能性があり、現在詳細な解析を続けている。

*dsm-1* は、アフリカツメガエル卵母細胞に強制発現させると、卵母細胞に予め取り込ませた D-セリンの放出が上昇した。COS 細胞に強制発現させた場合には、*dsm-1* 産生蛋白がゴルジ装置を中心とする細胞質に優位に検出されることより、*dsm-1* 産生蛋白は D-セリンの細胞小器官への輸送を促進し、D-セリンを含んだ小胞器官が細胞膜に移行して膜の融合等を介して、D-セリンが細胞外へ放出されるメカニズムも考えられる。動物の個体レベルで、*dsm-1* が D-セリンの細胞外放出に関与する可能性を検討するため、*dsm-1* 遺伝子ノックアウトマウスを作製中である。

高次脳機能障害を来す、さまざまな大脳皮質の局所的病変では、神経細胞死やグリア細胞の傷害が見られる。そこで、このときの D-セリンの病態を明らかにするため、神経細胞

体選択的な毒素のキノリン酸によって局所の神経細胞体を破壊した部位における細胞外 D-セリン濃度を測定し、著明に減少することを始めて明らかにした。前脳部では、D-セリンが主要な NMDA 受容体コ・アゴニストと考えられていることから、このような D-セリンシグナルの減少によって、NMDA 受容体の機能低下が生ずるまたは増強されることが示唆された。

一方、グリア選択的な毒性をもつことが報告されている、L- $\alpha$ -アミノアジピン酸により、軽度ながら、内側前頭葉皮質の細胞外液中 D-セリン濃度が有意に減少した。この所見は、グリアの傷害時にも D-セリンシグナルが減弱することを示唆している。また、可逆性の選択的グリア毒であるフルオロクエン酸が細胞外 D-セリン濃度を低下させるという昨年度の結果とともに、細胞外液中への D-セリンの放出にグリア細胞が関与することを支持している。実際に、培養したアストログリアでは、予め取り込ませた D-セリンが細胞外へ遊離されることが観察されている。今後は、どのような種類のグリア細胞が、D-セリンの細胞外シグナルの調節に関係するのかを明らかにすることが、D-セリンの病態を理解する上できわめて重要と考えられる。

### (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

今年度得られたデータから、観察された細胞死が D-セリンの D-アミノ酸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。

またクロルプロマジンの示す薬理作用に D-アミノ酸酸化酵素活性阻害の作用が寄与する可能性が示唆された。

### (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

小脳皮質で唯一の興奮性ニューロンである小脳顆粒細胞は平行線維と呼ばれる軸索により、

グルタミン酸を神経伝達物質として小脳プルキンエ細胞の樹状突起にシナプスを形成する。脊髄小脳変性症の一種であるオリブ橋小脳変性症で NMDA 結合型グルタミン酸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推定をした報告がある。一方顆粒細胞から放出されるグルタミン酸が病的に減少す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ると考えられる。遺伝性脊髄小脳変性症で glutamate dehydrogenase(GDH)の減少が報告されている。GDH はグルタミン酸の生成と分解のどちらにも働くが、平行常数からグルタミン酸合成側に偏っていると考えられており、GDH の減少はグルタミン酸の欠乏を引き起こすと考えられる。実際に一部の遺伝性脊髄小脳変性症で小脳皮質のグルタミン酸が減少していることが報告されている。以上の議論よりグルタミン酸アゴニストは少量投与で小脳性失調症状の改善に有効であるが、過剰に投与した場合は細胞毒性を呈する可能性がある。これまでの一日 50mg という投与量が至適であるかどうかは現在のところ確実でないが、増量により効果に著しい差がなければ、現在の一日 50mg を推奨投与量とすることが妥当であると考えられる。

## E. 結論

第二年度は、各分担研究者ともに、互いに連関した初年度の研究が進展し、脳の内在性物質 D-セリンの代謝・機能に関連する候補分子、高次脳機能を引き起こす病変における D-セリンの病態と治療法開発に対する意義、神経変性疾患患者に対する D-サイクロセリンによる D-セリンシグナル増強療法等について多くの新知見が得られた。

### (1) 脳の D-セリンの代謝・機能の分子機構に関する研究

内在性 D-セリンの代謝および機能を調節する候補分子として、新たに D-セリンに立体選択的応答を示し、D-セリンと分布が比較的類

似している遺伝子 *dser-3* を検出した。昨年度までにクローニングした *dsm-1* の産生蛋白は、D-セリンの細胞外放出を促進し、脳内における D-セリン遊離の分子機構に関係すると推測された。さらに、グリアまたは神経細胞が脳の局所で傷害されると、細胞外 D-セリンシグナルが低下することが明らかになった。これらの所見は、高次脳機能障害をもたらす局所的脳病変における D-セリンの病態の手がかりとなると考えられ、D-セリンシグナルを増強することが、高次脳機能障害の改善や進行遅延、増悪予防等に役立つ可能性を示唆している。

### (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

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意義に寄与すると考えられた。本研究が NMDA 受容体の機能異常に基づく神経・グリア細胞死などの神経疾患の病態に対する新規治療薬としての酵素阻害剤開発の基盤研究となる展開が期待される。

### (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

サイクロセリン用量依存性試験は現在進行中である。50mg と 100mg の間で効果に顕著な差がなければ、興奮性アミノ酸の細胞毒性の観点から 50mg を推奨投与量とすることが妥当である。

## 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. Shimazu D, Yamamoto N, Umino A, Ishii S, Sakurai S, Nishikawa T. Inhibition of d-serine accumulation in the *Xenopus* oocyte by expression of the rat ortholog of human

- 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter gene isolated from the neocortex as d-serine modulator-1. *J Neurochem* 2006; 96: 30-42.
2. Taniguchi G, Yamamoto N, Tsuchida H, Umino A, Shimazu D, Sakurai S, Takebayashi H, Nishikawa T. Cloning of a d-serine-regulated transcript *dsr-2* from rat cerebral neocortex. *J Neurochem* 2005; 95: 1541-1549.
  3. Nishikawa T. Metabolism and Functional Roles of Endogenous D-Serine in Mammalian Brains. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:1561-1565.
  4. X. Teng, T. Saka, L. Liu, R. Sakai, R. Kaji, K. Fukui : Attenuation of MPTP-induced neurotoxicity and locomotor dysfunction in Nucling-deficient mice via suppression of the apoptosome pathway. *J. Neurochemistry* : in press
  5. H. Park, Y. Shishido, S. Ichise-Shishido, T. Kawazoe, K. Ono, S. Iwana, Y. Tomita, K. Yorita, T. Sakai, K. Fukui: Potential Role for Astroglial D-Amino Acid Oxidase in Extracellular D-Serine Metabolism and Cytotoxicity. *J. Biochem.*: 139, 295-304 (2006)
  6. K. Fukui, H. Park, T. Kawazoe, K. Ono, S. Iwana, Y. Tomita, K. Yorita, T. Sakai, Y. H. Kim: Functional Roles and Pathophysiology of Brain D-Amino Acid Oxidase. *Flavins and Flavoproteins* 2005 : 853-860 (2005)
  7. K. Fukui, H. Park, T. Kawazoe, K. Ono, S. Iwana, K. Yorita, T. Sakai: Astroglial D-amino acid oxidase is the key enzyme to metabolize extracellular D-serine, a neuromodulator of N-methyl-D-aspartate receptor. *Amino Acids* 29 : 61-62 (2005)
  8. T. Kawazoe, S. Iwana, K. Ono, H. Park, K. Yorita, Y. Tomita, H. Tsuge, K. Fukui: Purification and Crystal Structure of Human D-Amino Acid Oxidase. *Flavins and Flavoproteins* 2005 : 33-36 (2005)
  9. G. Molla, M. S. Pilone, S. Sacchi, M. Barnasconi, K. Fukui, L. Pollegioni: Molecular Basis of Schizophrenia: Characterization of Human D-Amino Acid Oxidase. *Flavins and Flavoproteins* 2005 : 861-866 (2005)
  10. Y. Umena, K. Yorita, T. Matsuoka, M. Abe, A. Kita, K. Fukui, T. Tsukihara, Y. Morimoto: Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of L-lactate oxidase (LOX), R181M mutant, from *Aerococcus viridans*. *Acta Cryst F* 61: 439-441 (2005)
  11. K. Yorita, Y. Umena, T. Matsuoka, D. P. Ballou, M. Abe, A. Kita, T. Tsukihara, Y. Morimoto, K. Fukui: Crystal Structures of Wild-type and R181M L-Lactate Oxidase from *Aerococcus viridans*. *Flavins and Flavoproteins* 2005 : 43-48 (2005)
  12. K. Yorita, T. Matsuoka, D. P. Ballou, K. Fukui: H265Q L-Lactate Oxidase from *Aerococcus viridans*. *Flavins and Flavoproteins* 2005 : 37-41 (2005)
  13. 岩名沙奈恵、福井 清 : D-アミノ酸代謝システムによる脳機能制御の医化学. *ファルマシア* 41 : 857-861 (2005)
  14. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokohama K, Ota K, Kanda T, Fukuzawa T, Yamamura T: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiology of Disease* 18: 537-550, 2005.
  15. 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.
  16. 山本敏之, 大矢寧, 磯部建夫, 白藤俊彦, 尾方克久, 小川雅文, 川井充: Pioglitazone 長期投与による筋強直性ジストロフィーの糖尿病治療. *臨床神経* 45: 287-292, 2005.
  17. 鈴木幹也, 川井充: 進行性核上性麻痺と

- 鑑別すべき疾患. 医療 59(9): 482-485, 2005.
18. 多田羅勝義, 福永秀敏, 川井充: 国立病院機構における筋ジストロフィー医療の現状. 医療 60(2): 112-118, 2006.
- (2) 著書
1. Nishikawa T. Neuroanatomical and molecular changes in stress responses. Kato N, Kawata M and Pitman RK (eds.) PTSD brain mechanisms and clinical implications. Tokyo: Springer-Verlag; 2006. pp. 3-11.
  2. 西川 徹: 1. 統合失調症. 第7章 神経・精神疾患の分子機構. 森寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛 編. 脳神経科学イラストレイテッド(改訂第2版). 東京: 羊土社; 2006. pp. 276-283.
  3. ピーター・ハーパー(著), 川井充, 大矢寧(訳): 筋強直性ジストロフィー. 診断と治療社, 東京, 2005.
  4. 川井充: 筋強直性ジストロフィー. 神経疾患 最新の治療 2006-2008. pp264-266, 南江堂, 東京, 2006.
- (3) 総説
1. 西川 徹. ヒトの脳に存在する遊離型 D-セリンの機能と病態- 精神神経疾患の治療への応用-. ファルマシア 2005; 41: 863-868.
  2. 川井充: 筋ジストロフィーの研究の進歩と臨床への応用. MEDICAL REHABILITATION 51: 1-8, 2005.
  3. 川井充: 筋ジストロフィーの心筋障害- 一序論. 神経内科 62(6): 525-529, 2005.
  4. 川井充: 神経疾患における患者の訴え. 診断と治療 93(8): 18-22, 2005.
  5. 川井充: 骨格筋量の測定. Annual Review 神経 27-33, 2006.
- (4) その他
1. 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, 金子雄二郎, 竹林裕直, 柏 淳, 新垣浩, 車地暁生, 土田英人, 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療法開発に関する研究. 精神科薬療研究年報 2005; 37: 62-68
  2. 学会発表
    - (1) 特別講演・シンポジウム(海外)
      1. Nishikawa T, Kurumaji A, Ito T, Umino A, Ishii S. Molecular basis of developmental changes in stress responses. PTSD: Brain Mechanisms and Clinical implications. Tokyo, 2.17, 2005.
      2. Nishikawa T. Glutamate dysregulation in schizophrenia. Recent Progress in Basic and Clinical Research of Neuropsychiatric Diseases, Seoul, 2.25, 2005.
      3. Nishikawa T. A molecular pharmacological approach to the vulnerability to schizophrenia. Society of Biological Psychiatry 60th Annual Scientific Convention, Atlanta, 5.26, 2005.
      4. Nishikawa T. NMDA receptor, D-serine and Schizophrenia. 8th World Congress of Biological Psychiatry, Vienna, 7.1, 2005.
      5. Nishikawa T. NMDA receptor, D-serine system and the pathophysiology of schizophrenia. Tokyo Medical and Dental University 21st Century COE Program Brain Integration and Its Disorders Second International Symposium: Molecular and cellular mechanisms of schizophrenia and mood disorders - Recent progress -, Tokyo, 7.24, 2005.
      6. K. Fukui, H. Park, T. Kawazoe, K. Ono, S. Iwana, K. Yorita, T. Sakai : Astroglial D-amino acid oxidase is the key enzyme to metabolize extracellular D-serine, a neuromodulator of N-methyl-D-aspartate receptor. 9th International Congress on Amino Acids and Proteins (2005年8月ウィーン(オーストリア))
      7. Y. Umena, K. Yorita, T. Matsuoka, M. Abe, A. Kita, K. Fukui, T. Tsukihara Y. Morimoto : Structures of Arg-181 mutant and wild type of L-lactate oxidase from *Aerococcus viridans*. XX Congress of the International Union of Crystallography (2005

年 8 月 フローレンス (イタリア)  
(国内)

1. 西川 徹. 統合失調症の病因 - グルタミン酸系回路. Lilly Scientific Academy 3rd Draft, 東京, 4.8, 2005.
2. 西川 徹: 統合失調症の病態仮説. ヤンセンファーマ CNS フォーラム 2005, 東京, 7.10, 2005
3. 車地暁生. 統合失調症の神経科学研究 - review と introduction. 第 28 回日本神経科学大会, 横浜, 7.28, 2005.
4. 山本直樹, 西川 徹. D-セリンの脳内代謝調節による新規抗精神病薬の開発. 第 28 回日本神経科学大会, 横浜, 7.28, 2005.
5. 西川 徹. 脳の内在性 D-セリンの代謝・機能と精神神経疾患における意義. 第 1 回 D-アミノ酸研究会学術講演会. 東京, 9.2, 2005.
6. 西川 徹. ストレスが誘発する精神疾患の発症・再発の分子機構. ヒューマンストレス産業技術研究会: 第 7 回講演会「ストレスと精神疾患」. 東京, 9.20, 2005.
7. 車地暁生, 伊藤 卓, 海野麻未, 石井澄和, 西川 徹. Novel candidate genes for stress responses in the brain. 第 48 回日本神経化学学会大会, 福岡, 9.28, 2005.
8. 西川 徹. Developmentally regulated psychotomimetic-inducible genes: Implications for the pathophysiology of schizophrenia. 第 48 回日本神経化学学会大会, 福岡, 9.29, 2005.
9. 西川 徹. 脳の発達障害としての統合失調症. 第 8 回若手研究者のための生命科学セミナー ストレス ストレスから精神疾患に迫る - ストレスが脳を変える -. 東京, 10.14, 2005.
10. 西川 徹. 統合失調症の病態への分子薬理的アプローチ. 第 15 回 Neuroscience Seminar Tokushima. 徳島, 3.6, 2006.
11. 西川 徹. 治療薬開発研究の焦点. 日本統合失調症学会創立記念第 1 回大会: 記念シンポジウム「統合失調症研究の焦点」. 東京, 3.21, 2006
12. K. Fukui, H. Park, T. Kawazoe, S. Iwana, K. Ono, K. Yorita, T. Sakai, H. Tsuge : Potential roles for Astroglial D-amino acid oxidase in extracellular D-serine metabolism and cytotoxicity: Molecular approach to schizophrenia. International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors 2005 (2005 年 11 月 東浦町)
13. K. Fukui, H. Park, T. Kawazoe, K. Ono, S. Iwana, Y. Tomita, K. Yorita, T. Sakai, Y. H. Kim: Functional Roles and Pathophysiology of Brain D-Amino Acid Oxidase. The 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins (2005 年 4 月 葉山町)
14. T. Kawazoe, S. Iwana, K. Ono, H. Park, K. Yorita, Y. Tomita, H. Tsuge, K. Fukui : Purification and Crystal Structure of Human D-Amino Acid Oxidase. The 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins (2005 年 4 月 葉山町)
15. G. Molla, M. S. Pilone, S. Sacchi, M. Barnasconi, K. Fukui, L. Pollegioni : Molecular Basis of Schizophrenia: Characterization of Human D-Amino Acid Oxidase. The 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins (2005 年 4 月 葉山町)
16. K. Yorita, T. Matsuoka, D. P. Ballou, K. Fukui : H265Q L-Lactate Oxidase from *Aerococcus viridans*. The 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins (2005 年 4 月 葉山町)
17. K. Yorita, Y. Umena, T. Matsuoka, D. P. Ballou, M. Abe, A. Kita, T. Tsukihara, Y. Morimoto, K. Fukui : Crystal Structures of Wild-type and R181M L-Lactate Oxidase from *Aerococcus viridans*. The 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins (2005 年 4 月 葉山町)
18. 川井充: 筋ジストロフィー治療に関する最近の治療の進歩 第 19 回筋ジストロフィー対策埼玉研修会 2005 年 2 月 6 日 蓮田

19. 川井充：介入の効果判定のための QOL 評価尺度 MDQOL60 の開発 平成 16 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費筋ジストロフィー総合班会議 2005 年 1 月 21 日 東京
  20. 川井充：筋疾患の病理 第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会 教育コース 2005 年 5 月 14 日 宇都宮
  21. 川井充：「どのようにして新しい治療薬が市販されるようになるのか」ー新しい治療のしくみー 第 4 回日本 ALS 協会埼玉県支部総会 講演会 2005 年 6 月 18 日 大宮
  22. 川井充：筋ジストロフィーの医学的管理と治療ー最近の進歩 第 23 回三国立病院筋ジス保護者会交流研修会 2005 年 10 月 22 日 春日部
  23. 川井充：「難病患者と家族を地域で支える」 難病事例検討会ー難病患者を支える地域連携ー 2006 年 2 月 21 日 春日部
  24. 川井充：「筋萎縮性側索硬化症の診療と在宅療養支援」 平成 17 年度難病講演会(さいたま市保健所) 2006 年 2 月 28 日 さいたま
  25. 川井充：「筋疾患の診断 筋病理と画像診断を中心に」 神経筋疾患講演会(日本医師会生涯教育講座 学術講演会) 2006 年 3 月 10 日 旭川
  26. 川井充：筋ジストロフィーの診療 日本神経学会 2005 年度北海道地区生涯教育講演会 2006 年 3 月 12 日 札幌
- (2) 国際学会
- 一般学会
1. Takeuchi T, Furuta K, Hirasawa T, Masaki H, Yukizane T, Atsuta H, Arakaki H, Nishikawa T. Perospirone in the treatment of patients with delirium. 158th APA Annual Meeting, Atlanta, 5.26, 2005.
  2. Yukizane T, Arakaki H, Oshima K, Matsuda H, Hanamura S, Nishikawa T. Further analysis of regional cerebral blood flow in schizophrenia. 8th World Congress of Biological Psychiatry, Vienna, 7.1, 2005.
  3. Shimazu D, Yamamoto N, Umino A, Sakurai S, Nishikawa T. Molecular cloning of a D-serine modulator gene dsm-1. 8th World Congress of Biological Psychiatry, Vienna, 6.29, 2005.
  4. Kuroda Y, Motohashi N, Ito S, Takano A, Astuta H, Terada T, Suhara S, Nishikawa T. rTMS failed to change [11C]raclopride binding in depressed patients. 8th World Congress of Biological Psychiatry, Vienna, 6.29, 2005.
  5. Taniguchi G, Yamamoto N, Tsuchida H, Umino A, Shimazu D, Sakurai S, Takebayashi H, Nishikawa T. Cloning of a novel and D-serine-inducible transcript dsr-2. 8th World Congress of Biological Psychiatry, Vienna, 7.2, 2005.
  6. 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. 竹内 崇, 古田 光, 平沢俊行, 正木秀和, 行実知昭, 山本真基子, 新垣 浩, 西川 徹. せん妄に対するリスペリドン内用薬の使用経験. 第 101 回日本精神神経学会総会, 大宮, 5.20, 2005.
  2. 古田 光, 竹内 崇, 正木秀和, 行実知昭, 黒田裕子, 山本真基子, 新垣 浩, 寺田 倫, 大島一成, 本橋伸高, 車地暁生, 西川 徹. 短パルス矩形波治療器による認知機能の変化. 第 101 回日本精神神経学会総会, 大宮, 5.20, 2005.
  3. 山本真基子, 竹内 崇, 正木秀和, 行実知昭, 古田 光, 新垣 浩, 西川 徹. リエゾン・コンサルテーション精神医療における適応障害の治療. 第 101 回日本精神神経学会総会, 大宮, 5.20, 2005.
  4. 黒田裕子, 本橋伸高, 新垣 浩, 寺田 倫, 竹内 崇, 古田 光, 行実知昭, 正木秀和, 西川 徹. うつ病に対する経頭蓋磁気刺

- 治療法の有用性の検討. 大宮, 第 101 回日本精神神経学会総会, 大宮, 5.20, 2005.
5. 竹内 崇, 上里彰仁, 新垣 浩, 西川 徹. 下垂体鞍上部・松果体部胚細胞腫治療中に混迷状態と睡眠リズムの異常 (過眠) を呈した器質性精神障害の一例. 日本睡眠学会第 30 回定期学術集会, 宇都宮, 6.30, 2005.
  6. 黒田裕子, 本橋伸高, 伊藤滋朗, 高野晶寛, 熱田秀範, 寺田倫, 須原哲也, 西川徹. うつ病に対する反復性経頭蓋磁気刺激療法の有用性と脳内ドーパミンに与える影響. 第 35 回日本神経精神薬理学会・第 27 回日本生物学的精神医学会合同年会, 大阪, 7.7, 2005.
  7. 嶋津 奈, 山本直樹, 海野麻未, 石井澄和, 櫻井新一郎, 西川 徹. D-serine modulator 遺伝子 *dsm-1* による細胞内への D-セリン蓄積の制御. 第 28 回日本神経科学大会, 横浜, 7.27, 2005.
  8. 金子雄二郎, 柏 淳, 伊藤 卓, 西川 徹. フルオキセチンによるメタンフェタミン逆耐性の減弱. 第 28 回日本神経科学大会, 横浜, 7.28, 2005.
  9. 谷口 豪, 山本直樹, 土田英人, 海野麻未, 嶋津 奈, 竹林裕, 西川 徹. D-セリンに選択的応答を示す新規遺伝子 *dsr-2*. 第 1 回 D-アミノ酸研究会学術講演会. 東京, 9.2, 2005.
  10. 山本直樹, 嶋津 奈, 海野麻未, 石井澄和, 櫻井新一郎, 富田 麗, 西川 徹. 脳内 D-セリンの膜輸送動態に関する研究. 第 1 回 D-アミノ酸研究会学術講演会. 東京, 9.2, 2005.
  11. 兼松宗太郎, 石井澄和, 海野麻未, 山本直樹, 原 諭吉, 西川 徹. Effects of a glial toxin fluorocitrate on extracellular D-serine contents in the medial prefrontal cortex of the rat. 第 48 回日本神経化学学会大会, 福岡, 9.28, 2005.
  12. 山本直樹, 筒井啓太, 新垣 浩, 山本真基子, 車地暁生, 西川 徹. 青年期に異常行動を繰り返す長期予後良好であったシトルリン血症 II 型の一例. 東京精神医学会第 75 回学術集会. 東京, 11.5, 2005.
  13. 竹内 崇, 古田 光, 正木秀和, 行実知昭, 平沢俊行, 熱田英範, 西川 徹. せん妄に対する非定型抗精神病薬の使用経験. 第 18 回日本総合病院精神医学会総会, 松江, 11.12, 2005.
  14. 古田 光, 竹内 崇, 杉村 舞, 筒井啓太, 高木俊輔, 横溝美緒, 小澤いぶき, 熱田英範, 平沢俊行, 正木秀和, 行実知昭, 大島一成, 黒田裕子, 本橋伸高, 西川 徹. 気分障害患者における短パルス矩形波治療器による ECT の認知機能への影響. 第 18 回日本総合病院精神医学会総会, 松江, 11.12, 2005.
  15. 車地暁生, 行実知昭, 熱田英範, 武田充弘, 藤田宗久, 山本真基子, 渋谷治男, 西川 徹. 身体表現性障害を経過中に双極 II 型障害を呈し、リチウム投与によって寛解に至った一症例. 第 4 回 Bipolar Disorder 研究会. 東京, 11.19, 2005.
  16. 柏 淳, 金子雄二郎, 伊藤 卓, 石井澄和, 海野麻未, 山本直樹, 車地暁生, 西川 徹. セロトニン作動性薬物によるメタンフェタミン逆耐性の減弱- 統合失調症の再発予防へ向けて-. 第 37 回精神神経系薬物治療研究報告会, 豊中, 12.9, 2005.
  27. 宮武聡子, 谷田部可奈, 川井充, \*石原傳幸, \*\*埜中征哉: 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 2005 年 3 月 5 日 東京
  28. 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 2005 年 3 月 25 日 東京
  29. 大矢寧, 中村治雅, 小川雅文, 大出貴士, 有馬邦正, 川井充: 筋強直性ジストロフィーでのアミロイド沈着: 白血球 DMPK 遺伝子異常の軽度の 68 歳男性例

- 第46回日本神経病理学会総会学術研究会
30. 尾方克久、小川雅文、川井充：パーキンソン病における効用値QOL測定の妥当性
  31. 第46回日本神経学会総会 2005年5月25日 鹿児島
  32. 鈴木幹也、大矢寧、村上善勇、尾方克久、小川雅文、川井充：筋強直性ジストロフィーの低酸素血症時における鼻翼呼吸の有無 第46回日本神経学会総会 2005年5月26日 鹿児島
  33. 村上善勇、鈴木幹也、大矢寧、川井充：Duchenne型筋ジストロフィーにおける胸郭容積と最大強制吸気量の関連 第46回日本神経学会総会 2005年5月26日 鹿児島
  34. 大矢寧、村上善勇、鈴木幹也、小川雅文、川井充：Becker型筋ジストロフィーでの腹直筋残存 第46回日本神経学会総会 2005年5月27日 鹿児島
  35. 宮武聡子、岡橋里美、鈴木幹也、大友学、谷田部可奈、尾方克久、布施滋、川井充、竹内恵、埜中征哉：cytoplasmic bodyを小径筋線維に多数認める先天性ミオパチーの41歳女性例 第56回Neuromuscular Conference 2005年8月20日 東京
  36. 饗場郁子、今清覚、千田圭二、吉岡勝、岡伸幸、乾俊夫、橋口修二、尾方克久、川井充、湯浅龍彦：神経疾患における転倒・転落の発生頻度—政策医療神経総合湯浅班。転倒グループ共同研究— 第59回国立病院総合医学会 2005年10月14日 広島
  37. 吉岡勝、饗場郁子、今清覚、千田圭二、岡伸幸、乾俊夫、橋口修二、尾方克久、川井充、湯浅龍彦：神経疾患における転倒の合併症—政策医療神経総合湯浅班共同研究— 第59回国立病院総合医学会 2005年10月14日 広島
  38. 大友学、川井充、川城丈夫：頸椎症として治療されているうちに呼吸不全が出現して非侵襲的人工呼吸を実施した筋萎縮性側索硬化症の75歳男性 第43回埼

玉県医学会総会 2006年1月15日 さいたま市

#### その他

1. 柏 淳、谷口 豪、山本直樹、土田英人、海野麻未、嶋津 奈、竹林裕、西川 徹. 未規制を含む依存性薬物による精神障害の分子病態の解明—覚せい剤によって形成された逆耐性現象の発言に対するSSRIの作用—. 厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「依存性薬物および未規制薬物による神経毒性と精神病の発現機序に関する研究」班平成17年度研究成果報告会, 2.23, 2006.
2. 柏 淳、金子 雄二郎、伊藤 卓、石井澄和、海野麻未、山本直樹、車地暁生、西川 徹. セロトニン作動性薬物によるメタンフェタミン逆耐性の減弱—統合失調症の再発予防へ向けて—. 第37回精神神経系薬物治療研究報告会, 豊中, 12.9, 2005.
3. 西川 徹、山本直樹、海野麻未、石井澄和、嶋津 奈、谷口 豪、兼松宗太郎、藤平隆久、金子雄二郎、竹林裕直、小方茂弘、白久博史、柏 淳、車地暁生. 脳内D-セリン濃度の調節機構解明による統合失調症の新規治療法開発に関する研究. 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17年度研究成果報告会, 東京, 12.14, 2005.

#### 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。第二年度は、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-セリンの細胞内蓄積を減少させる dsm-1(D-serine modulator-1)の機能と局在に関する研究と、新たな D-セリン応答性遺伝子の検索を進めた。dsm-1 を強制発現させたアフリカツメガエル卵母細胞では、1)予め取り込ませた[3H]D-セリンの減少が dsm-1 を発現していない対照群より有意に早く、2)培養液中への[3H]D-セリンの放出が増加していることがわかり、dsm-1 が D-セリンの細胞外放出に関与する可能性が示唆された。DNA マイクロアレイ法およびリアルタイム RT-PCR 法を用いて、D-セリンに立体選択的反応を示し、大脳新皮質と小脳における分布と発達変化が D-セリンと類似している D-セリン応答性遺伝子をスクリーニングし、dsr-3 が検出された。さらに、キノリン酸の局所的注入により神経細胞体を選択的に破壊したラット内側前頭葉皮質では、D-セリンの組織中濃度だけでなく細胞外液中濃度が著明に減少し、虚血性脳疾患等による脳の局所的障害部位において NMDA 受容体への D-セリンシグナルが低下することが推測された。

### 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。

主任研究者らは、NMDA 型グルタミン酸受容体のコ・アゴニストとして作用する 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。

第二年度は、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-セリンの細胞内蓄積を減少させる *dsm-1*(D-serine responsive transcript-2)の解析を行い、新たに D-セリン選択的応答を示す遺伝子の検索を進めた。また、キノリン酸による神経細胞体を選択的に破壊した大脳皮質部位をモデルとして、虚血性脳疾患等のように局所的神経細胞死が生じた部位における D-セリンの病態を検討した。さらに、細胞外液中 D-セリン濃度の調節機構に関する実験も行った。

## B. 研究方法

全ての研究は、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、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、 $[^3\text{H}]\text{D-serine}$  (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  $[^32\text{P}]\text{UTP}$  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。 $[^32\text{P}]\text{dCTP}$  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. DNA マイクロアレイおよび半定量的 real-time RT-PCR

D セリンに立体選択的応答を示す遺伝子 (D-セリンによって発現が変化し、L-セリンには有意な影響を受けない遺伝子) の DNA マイクロアレイによる検索には、AFFYTMETRIX 社製 GeneChip の Rat Expression Array 230 を用いた。生後 8 日齢のラットに、D-セリン、L-セリンまたは生理的食塩水を腹腔内注射した (9mmol/kg) 3 時間後に大脳新皮質を取り出し、全 RNA を抽出した。5 匹のラットから得た全 RNA を一定量ずつプールして、GeneChip により遺伝子発現の差異を解析した。検出された D セリン選択的応答候補遺伝子の転写産物について、種々の組織における発現と、それらの発達に伴う変化を比較するため、Right Cycler システム (ロッシュ社製) を使って半定量 real-time RT-PCR を行った。

### 4. アフリカツメガエル卵母細胞に前負荷した D-セリンの放出に対する *Dsm-1* 蛋白の影響の観察

アフリカツメガエル卵母細胞で *Dsm-1* 蛋白を発現させるため、*dsm-1* cDNA のオープンリーディングフレームの部分、pBScMxt ベクターに組み込んで cRNA を合成し、卵母細胞に注入した。対照としては、卵母細胞に水またはアンチセンス cRNA を注入した。 $[^3\text{H}]\text{D-セリン}$  の細胞外放出を検討する実験では、予め 1mM の  $[^3\text{H}]\text{D-セリン}$  存在下で *dsm-1* cRNA または水を注入した卵母細胞を 26°C、60 分間インキュベートし、 $[^3\text{H}]\text{D-セリン}$  を細胞内に負荷した。これらの細胞を洗浄した後、D-セリンを含まないカエルリング液中に卵母細胞を移し、26°C で、経時的に細胞内外の  $[^3\text{H}]\text{D-セリン}$  を測定した。細胞外液中  $[^3\text{H}]\text{D-セリン}$  の増加と細胞内  $[^3\text{H}]\text{D-セリン}$  の減少の双方を観察することにより、 $[^3\text{H}]\text{D-セリン}$  の放出を検討した。

### 5. 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; CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mM; pH 7.3) の持続的灌流を開始した (流速 2  $\mu$ 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。

#### 6. 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。

#### 7. 内側前頭葉皮質神経細胞体の選択的破壊

50 日齢のラットに、神経細胞体の選択的破壊するキノリン酸 (240nmol/side) を、pentobarbital 麻酔下でステレオタキシーを用いて、両側の前頭葉皮質の内側部に局所注入した (AP +3.2mm, RV -0.6mm, VL+5.2mm)。対照群には、溶媒であるリン酸緩衝生理食塩水を注入した。この手術の 1 週間後に、pentobarbital 麻酔下で同じ部位に透析プローブを装着し (研究方法 6. の項を参照)、in vivo ダイアリス法により、細胞外液中 D-セリン濃度を検討した。

## C. 研究結果

### 1. 新規 D-セリン応答性遺伝子の検索

既知遺伝子でも、D-セリン選択的な応答を示すものが見出されたが、本研究では D-セリンの代謝・機能に関連する未知の遺伝子を明らかにすることが目的であるため、EST に限って検索を進めた。この中から、D-セリン投与後には有意に発現が上昇するが、L-セリン投与では変化が認められず、生後 8 日齢においては、大脳新皮質と小脳に同程度の発現が見られるが、成熟期の生後 50 日齢になると小脳の発現が低下し、肝臓では殆ど発現していない転写産物が検出された。これを、dsr-3 (D-serine responsive transcript-3) と名付け、現在、全長の cDNA その他の詳細を解析中である。

### 2. dsr-1 遺伝子産物の機能解析

dsr-1 の cRNA を注入したアフリカツメガエル卵母細胞では、水を注入した対照群に比較して、前負荷した [3H]D-セリンの蓄積が減少しており、昨年度までの検討結果が再現された。細胞内 [3H]D-セリン濃度の経時的変化を調べたところ、120 分間インキュベーションしても水注入群では変化は認められなかったのに対して、cRNA 注入群では、インキュベーション時間に伴って減少する傾向が続き、120 分後には開始時に比して有意に減少することがわかった。また、培養液中の [3H]D-セリン濃度は、30 分、60 分、90 分のいずれのインキュベーション時間においても cRNA 注入群の方が有意に高かった。

### 3. 前頭葉皮質におけるキノリン酸局所注入後の細胞外 D-セリン濃度の変化

キノリン酸注入により神経細胞体を選択的に破壊した、内側前頭葉皮質においては、リン酸緩衝生理食塩水を注入した偽出群に比べ、細胞外 D-セリンの基礎的濃度が著明に低下し、対照群の 30% 程度になることがわかった。この減少率は、既に報告したキノリン酸注入後の内側前頭葉皮質の組織中 D-セリンの減少率とほぼ同等であった。

### 4. 前頭葉皮質におけるグリア細胞選択的毒素灌流の細胞外 D-セリン濃度に与える影響