

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・分担研究報告書

(平成 18 年度)

主任研究者 西川 徹

平成 19 (2007) 年 3 月

総括研究報告書（平成 18 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 13

研究協力者 山本直樹, 海野麻未, 藤平隆久, 兼松宗太郎, 小柄 渚, 窪田哲朗

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 20

脊髄小脳変性症に対するサイクロセリンの二重盲検用量依存性クロスオーバー試験

川井 充 23

III. 研究成果の刊行に関する一覧 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 31

V. 平成 18 年度分担研究者氏名一覧 217

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。

第三年度は、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、グリア細胞に対する不可逆的毒素の α -アミノアジピン酸を内側前頭葉皮質内に注入した 7 日後には、同部位の組織中 D-セリン濃度が有意に減少し、前頭葉皮質においては D-セリン濃度の維持、調節にグリア細胞が関与しているという第二年度までの結果が支持された。また、培養したアストロサイトおよびニューロンには、同程度の抗 D-セリン抗体に対する免疫反応性と、細胞ホモジネート中 D-セリン濃度が検出され、D-セリンがグリアとニューロンの双方に含有されることが示唆された。D-セリン分解酵素の候補である D-アミノ酸酸化酵素については、本研究課題で結晶化に成功したヒト酵素の詳細な X 線結晶解析を進め、ブタ酵素と比較し、二量体を形成することと補酵素との反応に重要な残基のうち FAD のフラビン環 *re* 面の構造は共通しているが、フラビン環 *si* 面において、疎水性ストレッチの主鎖の構造が大きく異なっていることがわかった。さらに、抗精神病薬のクロルプロマジンが D-アミノ酸酸化酵素活性を阻害し、この効果は白色光で増強されることを見出した。

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 20 名において、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した。50mg 群と 100mg 群ともに投与前に比べて臨床症状の改善を認めたが、偽薬でも約 6 割の患者に効果が見られ、偽薬と比較して統計的に有意差はなかった。また 50mg 群と 100mg 群との間に有意差はなく、副作用も出現しなかったことより、今後は、50mg を一日量とした長期試験を行い、有用性を確認する必要があると考えられる。一方、動物実験より、D-サイクロセリンの全身的投与が前頭葉の細胞外液中 D-セリン濃度を上昇させることが明らかになり、細胞外 D-セリンシグナルの調節機序や D-サイクロセリンの臨床用量の設定の手がかりとして期待される。

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

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

A. 研究目的

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、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。

第三年度は、第二年度までの成果にもとづいて、細胞外 D-セリン濃度の調節の分子細胞メカニズムをさらに検討する目的で、ラット内側前頭葉皮質において、1) グリア細胞に不可逆的な変化を与える毒素による組織中 D-セリン濃度への影響、2) 本研究で小脳失調に対する臨床試験を進めており、他の精神神経疾患の試験的治療にも応用されている、NMDA 受容体の部分的コ・アゴニストの D-サイクロセリンが細胞外 D-セリン濃度に及ぼす影響等を調べるとともに、3) 胎生または新生ラット大脳新皮質から培養したアストロサイトおよびニューロンにおける D-セリンの免疫組織学的・生化学的検討を行った。また、第二年度までに結晶化に成功した、D-セリン分解酵素の候補である D-アミノ酸酸化酵素について、X 線結晶解析と阻害薬およびその臨床的意義の検討を進めた。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、今年度で、目標とした 20 例の用量依存性の二重盲検クロスオーバー試験を終了した。

B. 研究方法

本課題に関連して進めた動物実験およびヒトを対象とした研究は、全て、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

実験には、胎生 18～20 日齢、および生後 1～2 日または 50 日齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。D-サイクロセリンの全身的投与実験では、生後 50 日齢のラットを対象とし、50mg/kg および 100mg/kg (Sigma-Aldrich, Co. Ltd., St. Louis, USA) を腹腔内に注射した。

2. 細胞培養

(i) アストロサイトの培養

生後 2 日以内のラット大脳皮質からトリプシン処理により調製した細胞を 0.5×10^6 cells/cm² で 75cm² プラスチックフラスコに播種し、basal medium eagle complete (BMEC; fetal calf serum(FCS); 10%, NaH₂PO₄; 0.14 g/L, D-glucose; 0.59%, L-glutamine; 0.534 g/L, penicillin; 25 unit/mL, streptomycin; 25 μg/mL, basal medium eagle; BME) を培養液として、37°C, 5% CO₂ で 2 週間培養し、mixed glial cell culture とした。なお、培養液は 3 日おきに全量を交換した。10 から 14 日後に、培養液で 3 回洗いマイクログリアを除去し、260rpm で一晚振とうした後に 350rpm でさらに 30 分間振とうした。この上清を OPC として Type II アストロサイトの培養に、フラスコに接着している細胞を Type I アストロサイトの培養に用いた。接着した細胞はトリプシン処理によ

り回収した。

上清はフラスコに移し、30rpm で 30 分間緩やかに振とうを行う事により、OPC 以外の細胞を接着させ除去した。さらにこの上清をポリエチレンイミンでコーティングした 24 穴プラスチックプレートに、 5.0×10^4 cells / cm^2 で播種し、10ng/mL PDGF を含む neurobasal medium (NBM+B27; B27 supplement; 2%, L-glutamine; penicillin; 25 unit/mL, streptomycin; 25 μ g/mL, 0.534 g/L)を用いて OPC を選択的に培養した。

上記 2 種の細胞は、24 穴プラスチックプレートに 10%FCS を含む DMEMg (Hepes; 25mM, pH 7.4, penicillin; 25 unit/mL, streptomycin; 25 μ g/mL, Dulbecco's modified essential medium-low glucose)を用いて、 3×10^4 cells / cm^2 で播種した。さらに、翌日と 3 日後にそれぞれの目的に応じた培養液に交換し、その 3 日後の培養上清と細胞を回収した。

(ii)ニューロンの培養

胎生 18 または 19 日のラット大脳皮質を取り出し、パパイン処理により調整した細胞を、 2.5×10^5 cells / cm^2 でポリエチレンイミンコーティングした 24 穴プラスチックプレートに播種した。培養液は DMEMh+FCS/HS (FCS; 5%, horse serum; 5%, penicillin; 25 unit/mL, streptomycin; 25 μ g/mL, Dulbecco's modified essential medium-high glucose)を用いた。翌日と 4 日後にそれぞれの目的に応じた培養液に交換し、その 3 日後の培養上清と細胞を回収した。DMEMh+FCS/HS で培養したものは、アストロサイトと神経が存在する共培養系となり、NBM+B27 に交換した場合は神経が優位に存在することが確認された。

3. 抗 D-セリン抗体

KLH (keyhole limpet hemocyanine) にグルタルアルデヒドで D-セリンを架橋したものを抗原として、ウサギに免疫することにより、グ

ルタルアルデヒドの架橋部分を含む D-セリンに特異的に反応する抗血清を得た。この抗血清 (アフィニティカラムで精製) は、培養細胞の免疫染色に用いた D-セリンに反応する濃度ではグリシン、L-セリン、L-および D-アラニン、L-および D-システイン、D-スレオニン、D-アスパラギン酸等には反応しないことを確認した。

4. 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。

5. 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 を加えて誘導體化した後、さらに蛍光測定用誘導體化のため 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。

6. 内側前頭葉皮質グリア細胞の選択的損傷

50 日齢のラットに、シスチン-グルタミン酸アンチポーターを阻害することにより、グ

リア選択的毒性を発揮する α -アミノアジピン酸を、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、両側の内側前頭葉皮質を取り出しHPLC法により、組織中D-セリン濃度を定量した。

(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両群を10例ずつとした。てんかんや精神障害を有する患者は除外した。サイクロセリン以外の薬剤とリハビリテーションは研究期間中変更しなかった。サイクロセリンは朝夕食後に2分割10日間投与した。2群とも偽薬とのクロスオーバー試験とし、クロスオーバーの間は10日間の休薬期間を設定した。薬剤の調剤および患者の両群への割付は国立精神・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した。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、自覚症状記録。主要評価項目はICARSとした。一般採血検査、検尿、脳波をおこない自覚症状とともに副作用のチェックとした。

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。インフォームドコ

ンセントを得るために、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被験者本人に文書で同意を得た。研究に参加しなくてもなんら不利益を受けないこと、研究に参加意思を表明したあともいつでも参加を取りやめることができることも説明した。

統計方法は、50mg投与群と100mg投与群との患者の年齢はt検定、性別はカイ二乗検定を用いた。投与前後の検定はパラメトリックな指標はrepeated-ANOVAをもちい、ノンパラメトリックな指標はフリードマン検定を行った。これらの検定で有意差があればpost-hoc検定を行った。全ての統計で危険率5%以下を有意とした。

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. グリア毒の前頭葉組織中D-セリンに対する影響

α -アミノアジピン酸を注入して7日後のラット内側前頭葉皮質内では、組織中D-セリン濃度が有意に減少した(-13%)。しかし、L-セリン、グリシン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-アスパラギン、L-トレオニン、L-アラニン、L-アルギニン、タウリン等のアミノ酸濃度には変化が認められなかった。

2. D-サイクロセリンの前頭葉細胞外液中D-セリンに対する影響

本研究課題において、小脳失調に対する臨床投与試験を進めているD-サイクロセリンは、D-セリンと化学構造上類似していることから、D-セリンシステムに影響する可能性が考えられる。そこで、全身的にD-サイクロセリンを投与し、内側前頭葉皮質の細胞外液中D-セリンへの影響を投与後160分までの間検討した。予備的検討は第一年度に行ったが、本年度はその結果を参考に、用量の展開、動物数や分析対象とするアミノ酸の種類を増やす等を通じて詳細な解析を進めた。D-サイクロセリン

50mg/kg および 100mg/kg の腹腔内投与後、前頭葉皮質の細胞外 D-セリン濃度が用量にしたがって有意に増加し、それぞれ最大で基礎値の 138% および 174% に達した。これとは対照的に、L-セリン、グリシン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-アスパラギン、L-トレオニン、L-アラニン、L-アルギニン、タウリン等のアミノ酸濃度には有意な変化が認められなかった。

3. ラット大脳新皮質のグリアおよびニューロンの培養系における D-セリンの免疫組織化学的・生化学的検討

新生ラット大脳新皮質から、Type I および Type II アストロサイトを培養したところ、双方で抗 D-セリン抗体に対する軽度の免疫反応が検出された。また、胎生期ラット大脳新皮質から培養した、ニューロンが主体となる細胞系でも、上記のアストロサイトと同程度の D-セリン様免疫反応が観察された。さらに、これらの細胞のホモジネートでアミノ酸定量を行った結果、同様の濃度の D-セリンが検出された。この D-セリン濃度は、出生時ラットの大脳皮質と低濃度（50%未満）であることがわかった。

(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

D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) は FAD を補酵素とするフラビン酵素の一つで、生体内では腎臓、肝臓、脳において、細胞内のペルオキシソームに局在する。本研究では、ヒト DAO の立体構造を明らかにするとともに、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による、ヒト DAO 阻害機構の解析を行った。

まず、ヒト酵素の結晶構造（三次元構造）を X 線結晶解析により 2.5 オングストロームの分解能で決定した。ヒト酵素はブタ酵素と同様に二量体（39 kDa が二分子）を形成しており、反応に重要な残基は FAD のフラビン環の *re* 面においては完全に保存されていた。しかしながらフラビン環の *si* 面において、一次

構造が完全に同一であるにも関わらず、疎水性 ス ト レ ッ チ （残基 47-51, Val-Ala-Ala-Gly-Leu）の主鎖の構造がブタ酵素と比べて大きく異なっていた。

我々は既にラット 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ている。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。クロルプロマジンによる、DAO に対する阻害作用は、既にブタ酵素において、FAD に対する拮抗阻害であることが報告されているが、ヒト酵素において検討したところ、同様に阻害作用を示すことが明らかとなった。さらに、クロルプロマジンが投与患者において光線過敏症を引き起こすこと、また紫外線やペルオキシダーゼ等によりラジカルを生じることから、生体内でより強い阻害剤に変化する可能性が考えられた。そこで、本薬剤に白色光を照射して阻害活性の変化を検討したところ、本酵素に対する阻害活性の上昇が認められた。

(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

50mg 群は年齢 58.8 ± 12.9 歳、男性 6 例、女性 4 例。診断は小脳症状が強い多系統萎縮症 (MSA-C) 4 例、小脳皮質変性症 (CCA) 1 例、Machado-Joseph 病 (MJD) 3 例、SCA6 1 例、遺伝子診断陰性の家族性 SCD 1 例。100mg 群は 59.0 ± 8.6 歳、男性 6 例、女性 4 例。MSA-C 4 例、CCA2 例、MJD2 例、SCA6 2 例。両群の年齢や性別に有意な差はなく病型にも大きな差はなかった。

50mg 群と 100mg 群では効果にほとんど差がみられなかったため両群を合わせて統計した結果を記載する。ICARS の総点では、サイクロセリン投与前 38.2 ± 10.4 、投与後 36.9 ± 10.8 、偽薬投与前 39.1 ± 11.4 、投与後 37.5 ± 10.8 とともに投与後で有意に改善していた。サイクロセリン投与後と偽薬投与後には有意な差はなかった。ICARS の下位項目の各点では改善傾向はしめしたものの有意差を認めたものはなかった。10m 往復平地歩行時間 (秒) は、サイクロセリン投与前 55.4 ± 50.1 、投与後 50.4 ± 40.5 、偽薬では投与前 50.3 ± 46.5 、投与後 51.3 ± 48.4 と実薬でのみ改善傾向を示したが危険率は 7% で統計的に有意ではなかった。Barthel 指数には、実薬、偽薬とも投与前後で変化はみられなかった。病型による差はあまり認められなかった。

自覚症状、採血・検尿、脳波では特に投与による副作用は認めず全例で投与に問題は生じなかった。

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

昨年度までの研究で、脳梗塞、神経変性疾患等で高次脳機能障害の基盤となる神経細胞損傷脳部位においては、ラット前頭葉神経細胞体の破壊実験より、D-セリンの細胞外液中および組織中濃度が著明に低下していることが明らかになり、D-セリンシグナル減少による NMDA 受容体機能不全が推測される。また、グリア細胞活動の急性低下によっても D-セリンシグナルが低下することが示唆されている。今年度は新たに、グリア細胞の不可逆的障害において前頭葉皮質組織中の D-セリンが選択的に低下することがわかった。さらに D-セリンは、大脳新皮質よりニューロンとアストロサイトを分離した状態で培養した条件下でも、双方に含まれることが免疫組織化学的ならびに定量的検討から示唆された。一方、高次脳機能障害の治療への導入を試みている D-

サイクロセリンが、脳の細胞外 D-セリンを増加させることが見出された。

グリア細胞の不可逆的毒素の α -アミノアジピン酸を注入した脳局所で、脳内のアミノ酸のうち D-セリンに選択的な減少が引き起こされた点は、ニューロンとグリアの両方がともに D-セリンシグナル調節に重要であることを支持する新しい根拠と考えられる。特に D-セリンが強く影響される理由は明らかではないが、D-セリン代謝系が他のアミノ酸代謝系に比して、脳障害時の補償メカニズムが作用し難く、脆弱である可能性がある。したがって、薬物等により D-セリンシグナルを補強することは、脳局所の損傷にもとづく高次脳機能異常の治療法として意義があると推察される。

本研究課題で川井らが進めている D-サイクロセリンによる高次脳機能障害の改善の試みは、D-サイクロセリンが NMDA 受容体のグリシン調節部位に D-セリン様の作用を及ぼすことから、このような方向性に沿った治療戦略と言える。今年度の動物実験から、D-サイクロセリンには、従来知られていた上記の NMDA 受容体の部分的コアゴニストとしての作用する以外に、細胞外液中の D-セリンを増加させることによっても NMDA 受容体機能を促進し、治療効果を発揮する可能性があることが明らかになった。D-サイクロセリンは、部分的コアゴニストであるため、臨床用量の設定が難しく、できるだけ少量の投与が望ましいが、以上の作用は、D-サイクロセリンの投与量の抑制を検討するのに、きわめて有用と考えられる。

D-サイクロセリンによる細胞外液中の D-セリンを増加は、これまでに報告されている D-サイクロセリンの薬理作用のうち、1) D-セリン取り込み能をもつ proton/amino acid transporter 1 (PAT1) または PAT2 の阻害、2) D-セリン分解能をもつ D-アミノ酸酸化酵素活性の抑制等によってもたらされている可能性がある。この解明は、今後の検討をまたなけれ

ばならないが、D-セリン—NMDA 受容体シグナルを増強する治療薬の標的分子の手がかりになることが期待される。

高次脳機能障害におけるD-セリンシステムの病態とそれに対する治療法を開発するためには、D-セリンの各代謝系を備えた脳細胞の種類を同定することが不可欠である。D-セリンは、主にアストロサイトで合成・貯蔵され、グルタミン酸受容体の調節下にここから放出されるという仮説が提唱されているが、最近では、ニューロンにもD-セリン免疫反応を認めたと報告が複数の研究者から発表され、未だ結論が得られていない。私たちのデータは初代培養細胞という制約があるが、少なくとも双方に同程度のD-セリンが含有されることを支持している。培養細胞中のD-セリン濃度が、生体における濃度より低いことから、異なる培養条件や他種類の脳細胞についても、詳細な検討を要すると考えられる。

(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

ヒト DAO 結晶構造の疎水性ストレッチの主鎖の構造はブタ酵素と異なっていたが、グリシンを含むペプチドには、環境依存性に「主鎖の構造の多様性」が存在し、Structurally ambivalent peptide (SAP) として知られている。したがって本酵素にも VAAGL ストレッチにおける“構造のゆらぎ”が存在し、ヒト酵素に特徴的な酵素化学的性質の一因として考えられた。

また、D-セリンの投与により観察される細胞死が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。さらにクロロ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型であるオリーブ橋小脳変性症で 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。

今回の検討では短期投与では 50mg と 100mg 投与群には差はみられなかったので 50mg 投与で実際上十分であると推測される。今回の検討では投与により改善をみとめたことは確かであるが偽薬でも ICARS 総点では 20 人中 12 人もの患者で改善をみており実薬投与と偽薬投与間に有意差がでなかった。これまでの我々の検討でもサイクロセリンで全く効果のない脊髄小脳変性症患者もみられるので偽薬で6割の患者に有効性を認めると統計上の有意差はかなりでにくいものと思われる。

今回の検討でも歩行時間では実薬のみ改善傾向を認めており効果判定に偽薬効果がより出にくい指標を用いることも必要と思われる。また今回は 10 日間の短期投与であったのでより長期の投与期間による検討も必要と思われる。

E. 結論

第三年度においても、初年度から引き続き、各研究者間で相互に関係した研究が進展した。基礎的研究では、脳の内在性物質 D-セリンの代謝・機能にグリアおよびニューロンの双方が関連すること、D-アミノ酸酸化酵素の D-セリンシグナル調節薬の標的分子としての意義、等について新たな成果が得られた。また、D-サイクロセリンに関しては、小脳失調に対する二重盲検試験が終了するとともに、脳内の D-セリン-NMDA 受容体系への新規の作用が見出され、高次脳機能障害への D-セリンシグナル増強療法の発展に貢献した。

(1) 脳の D-セリンの代謝・機能の分子機構に関する研究

不可逆的グリア毒素を注入した内側前頭葉皮質で、組織中 D-セリン濃度が低下することや、ラット大脳皮質から培養したアストロサイトおよびニューロンにおいて D-セリンが免疫組織化学的・生化学的に検出され、D-セリン代謝にグリアとニューロンの双方が関与することを示す昨年度までの研究結果が強く支持された。また、D-サイクロセリンの新たな薬理作用として、細胞外液中 D-セリン濃度を上昇させることが見出され、NMDA 受容体のグリシン調節部位刺激作用とともに、高次脳機能障害改善効果をもたらす NMDA 受容体機能の促進に関係していることが示唆された。この所見は、D-サイクロセリンの臨床応用における用量設定に重要な意義があるばかりでなく、D-セリン-NMDA 受容体シグナル増強薬開発の新規標的分子の手がかりになると考えられる。

(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

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

今回の検討で 50mg と 100mg の間で効果に顕著な差がなかったため、興奮性アミノ酸の細胞毒性の観点から一日 50mg を推奨投与量を行うことが妥当である。効果の有無をより正確に判定するため評価の指標を工夫しさらに長期の投与による研究が必要である。

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. Kaneko Y, Kashiwa A, Ito T, Ishii S, Umino A, Nishikawa T. Selective serotonin reuptake inhibitors, fluoxetine and paroxetine, attenuate the expression of the established behavioral sensitization induced by methamphetamine. *Neuropsychopharmacol* 2007; 32: 658-664.
2. Takeuchi T, Furuta K, Hirasawa T, Masaki H, Yukizane T, Atsuta H, Nishikawa T. Perospirone in the treatment of patients with delirium. *Psychiatry Clin Neurosci* 2007; 61: 67-70.
3. Tanaka Y, Obata T, Sassa T, Yoshitome E, Ikehira H, Suhara T, Okubo Y, Nishikawa T. Quantitative magnetic resonance spectroscopy of schizophrenia: relationship between decreased N-acetylaspartate and frontal lobe dysfunction. *Psychiatry Clin Neurosci* 2006; 60: 365-372.
4. Kuroda Y, Motohashi N, Ito H, Ito S, Takano A, Nishikawa T, Suhara T. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on [¹¹C] raclopride binding and cognitive function in patients with depression. *J. Affect.*

- Disorder, 2006; 95: 35-42.
5. Kanematsu S, Ishii S, Umino A, Fujihira T, Kashiwa A, Yamamoto N, Kurumaji A, Nishikawa T. Evidence for involvement of glial cell activity in the control of extracellular D-serine contents in the rat brain. *J Neural Transm* 2006; 113: 1717-1721.
 6. T. Kawazoe, H. Tsuge, T. Imagawa, K. Aki, S. Kuramitsu, K. Fukui: Structural basis of D-DOPA oxidation by D-amino acid oxidase: alternative pathway for dopamine biosynthesis: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 355: 385-391.
 7. T. Kawazoe, h. Tsuge, M. S. Pilone, K. Fukui: Crystal structure of human D-amino acid oxidase: context-dependent variability of the backbone conformation of the VAAGL hydrophobic stretch located at the si-face of the flavin ring: *Protein Sci.* 2006; 15: 2708 – 2717.
 8. Y. Umena, K. Yorita, T. Matsuoka, A. Kita, K. Fukui, Y. Morimoto: The crystal structure of L-lactate oxidase from *Aerococcus viridans* at 2.1 Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 350: 249-256.
 9. G. Molla, S. Sacchi, M. Bernasconi, M. S. Pilone, K. Fukui, L. Pollegioni: Characterization of human D-amino acid oxidase: *FEBS Letters* 2006; 580: 2358-2364.
 10. X. Teng, T. Sakai, 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* 2006; 97: 1126-1135.
 11. 朴 煥埼, 川添僚也, 岩名沙奈恵, 小野公嗣, 頼田和子, 坂井隆志, 福井 清. 生体内不斉アミノ酸分子の病態生理学的意義: *日本応用酵素協会誌* 2006; 41: 21-31.
- (2) 著書
1. Nishikawa T. A systematic approach to the brain d-serine system. Fujii N, Homma H, Bruecker H, Fisher GH, Konno R (eds.) *A New Frontier in Amino Acid and Protein Research.* New York: Nova Science Publishers; 2007, in press.
 2. 濱村貴史, 山本直樹, 黒田安計, 西川徹. 抗精神病薬の作用機序. *精神科薬物療法研究会編. 統合失調症の薬物治療アルゴリズム.* 東京: 医学書院; 2006. pp. 95-122.
 3. 谷口 豪, 西川 徹. 3. グルタミン酸-D-セリンシステムと統合失調症. V. 「グルタミン酸」と「てんかん、統合失調症」. 鶴紀子編. *脳とこころの科学.* 東京: 新興医学出版; 2006. pp. 114-123.
- (3) 総説
1. Yui K, Kajii Y, Nishikawa T. Neurobiological and molecular bases of methamphetamine-induced behavioral sensitization and spontaneous recurrence of methamphetamine psychosis, and its implication in schizophrenia. *Current Psychiatry Reviews* 2006; 2: 381-393.
 2. 西川徹. 統合失調症の分子機構研究の最前線; 疾患解明 Overview. *実験医学.* 2006; 24: 2663-2671.
 3. 西川 徹. 脳の発達障害としての統合失調症. *日本薬理学雑誌.* 2006; 128: 13-18.
 4. 日比野英彦, 西川 徹. アシル化アミノ酸の行動薬理的評価—脂質による高次脳機能異常改善作用の機序を中心に—. *オレオサイエンス* 2006; 6: 93-105.
 5. 山本直樹, 西川徹. 違法ドラッグと依存性薬物による精神障害の分子病態. *医学のあゆみ.* 2006; 217: 1147-1151.
 6. 熱田英範, 西川 徹. 統合失調症の薬理的発展; 特集「統合失調症解明へのアプローチ」. *精神科* 2006; 8: 257-263.
 7. 正木秀和, 西川 徹. 統合失調症の治療

薬開発研究; 特集「新しい時代の統合失調症—研究から治療へ—」. 臨床精神医学 2007; 36: 43-51.

2. 学会発表

(1)特別講演・シンポジウム

(海外)

1. K. Fukui: Potential Role for Astroglial D-amino Acid Oxidase in Extracellular D-Serine Metabolism and Pathogenesis of Schizophrenia. The 47th International Symposium of Korean Society of Life Science (2006年9月 大邱市 (韓国))

2. K. Fukui: Potential Role for Astroglial D-amino Acid Oxidase in Extracellular D-Serine Metabolism and Pathogenesis of Schizophrenia. The 14th Symposium of Dongguk University Medical Research Institute (2006年9月 慶州市 (韓国))

(国内)

1. 西川 徹. 薬理的に見た統合失調症の分子病態. 岐阜薬科大学大学院特別講義. 岐阜, 6.26, 2006.

2. 西川 徹. 脳内 D-セリンの代謝・機能の分子機構と病態—グリアとの関連に注目して—. 特定領域班「神経-グリア回路網」サマーワークショップ「グリア研究の新しい展開を求めて」. 熱海, 7.13, 2006.

3. 西川 徹. 統合失調症における神経情報処理障害の分子基盤. 日本薬学会 第 22 回創薬セミナー. 甲斐大泉, 7.26, 2006.

4. 西川 徹, 山本直樹, 柏 淳, 石井澄和, 海野麻未, 竹林裕直, 嶋津 奈, 佐藤潤子, 平岡優一, 車地暁生. 統合失調症の分子異常への薬理的・発達神経学的アプローチ. 科学研究費補助金 (特定領域研究) 第 5 領域「病態脳」夏のワークショップ, 札幌, 8.22, 2006.

5. 西川 徹. 統合失調症の分子異常への発達神経科学的アプローチ. 科学研究費補助金特定領域研究「ゲノム」4 領域 2006

年度合同班会議. 大阪, 9.21, 2006.

6. 西川 徹. グリア・ニューロンモジュレーターとしての D-セリンと精神神経疾患. 第 11 回グリア研究会. 東京, 11. 10, 2006.

(2) 国際学会

1. K. Yorita, Y. Umena, T. Matsuoka, D. P. Ballou, A. Kita, Y. Morimoto, K. Fukui: Active Site Topology of L-Lactate Oxidase from *Aerococcus Viridans*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006年6月 京都市)

2. S. Iwana, K. Yorita, T. Kawazoe, S. P. Chung, R. Abou El-Magd, H. K. Park, K. Fukui: Inhibitory effect of an antipsychotic, chlorpromazine, and its derivative on D-amino acid oxidase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006年6月 京都市)

3. K. Ono, H. Park, T. Kawazoe, S. Iwana, S. P. Chung, R. Abou El-Magd, Y. Tomita, K. Yorita, T. Sakai, K. Fukui: Gene Expression of D-Amino Acid Oxidase in the brain. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006年6月 京都市)

4. L. Liu, S. Takashi, X. Teng, R. Mukai-Sakai, R. Kaji, K. Fukui: Nucling inhibits nuclear translocation and activation of NF- κ B through interaction with NF- κ B-p50. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006年6月 京都市)

5. T. Kawazoe. H. Tsuge, M. S. Pilon, K. Fukui: Crystal structure of human D-amino acid oxidase: Implications for a Hypothetical Activation Mechanism. 20th IUBMB

- International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006年6月 京都市)
6. X. Teng, T. Sakai, L. Liu, R. Sakai, R. Kaji, K. Fukui: Attenuation of MPTP-induced neurotoxicity and locomotor dysfunction in Nuclng-deficient mice via suppression of the apoptosome pathway. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006年6月 京都市)
 7. T. Sakai, L. Liu, R. Mukai-Sakai, N. Sano, R. Kaji, K. Fukui: Pro-inflammatory stress promotes carcinogenesis through NF- κ B-activation and inactivation pathway. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006年6月 京都市)
 8. Y. Kaneko, A. Kashiwa, T. Ito, S. Ishii, A. Umino and T. Nishikawa Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, Fluoxetine and Paroxetine, Attenuate the Expression of the Established Behavioral Sensitization Induced by Methamphetamine. Keystone Symposia; Neurobiology of Addiction (C3), Santa Fe, 2.25-3.1, 2007.
- (3) 国内学会
1. 西川 徹, 山本直樹, 海野麻未, 石井澄和, 藤平隆久, 兼松宗太郎, 小方茂弘, 白久博史, 小柄 渚. 脳における細胞外液中 D-セリン濃度の調節機構- グリア毒および神経毒の影響-. 第2回 D-アミノ酸研究会学術講演会. 京都, 9.8, 2006.
 2. 車地暁生, 伊藤 卓, 石井澄和, 海野麻未, 西川 徹. An investigation of candidate genes for stress responses in the hippocampus. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会合同年会, 名古屋, 9.14, 2006.
 3. 山本直樹, 村岡新一郎, 梶井 靖, 海野麻未, 柏 淳, 西川 徹. Characterization of a novel methamphetamine-induced transcript mrt3 in the rat cerebral cortex. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会合同年会, 名古屋, 9.14, 2006.
 4. 藤平隆久, 兼松宗太郎, 海野麻未, 石井澄和, 小方茂弘, 白久博史, 山本直樹, 西川 徹. Effects of D-cycloserine on the extracellular contents of D-serine in the rat frontal cortex. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会合同年会, 名古屋, 9.14, 2006.
 5. 竹林裕直, 山本直樹, 西川 徹. Phencyclidine-induced gene expression in the thalamus of developing rats. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会合同年会, 名古屋, 9.16, 2006.
 6. 小方茂弘, 兼松宗太郎, 藤平隆久, 石井澄和, 海野麻未, 山本直樹, 西川 徹. Effects of selective gliotoxins on extracellular D-serine contents in the rat medial frontal cortex. Effects of selective gliotoxins on extracellular D-serine contents in the rat medial frontal cortex. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会合同年会, 名古屋, 9.16, 2006.
 7. 白久博史, 藤平隆久, 兼松宗太郎, 石井澄和, 海野麻未, 山本直樹, 西川 徹. Effects of clozapine on extracellular contents of various amino acids in the rat frontal cortex. Effects of clozapine on extracellular contents of various amino acids in the rat frontal cortex. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会合同年会, 名古屋, 9.16, 2006.

- 屋, 9.16, 2006.
8. 竹内 崇, 行実知昭, 正木秀和, 熱田英範, 宮本康史, 治徳大介, 川上礼子, 甫母瑞枝, 西川 徹. 東京医科歯科大学医学部附属病院における精神科コンサルテーション・リエゾン活動. 第 19 回日本総合病院精神医学会総会, 宇都宮, 12.2, 2006.
 9. 山本直樹, 嶋津奈, 海野麻未, 石井澄和, 櫻井新一郎, 谷口豪, 小柄 渚, 金子雄二郎, 竹林裕直, 兼松宗太郎, 柏 淳, 車地 暁生, 西川 徹. グルタミン酸- D-セリン系に作用する統合失調症の新規治療薬開発に関する研究. 第 39 回精神神経系薬物治療研究報告会, 豊中, 12.8, 2006.
 10. 岩名沙奈恵, 頼田和子, 川添僚也, 小野公嗣, 鄭 丞弼, Rabab Abou El-Magd, 朴 煥埼, 福井 清: 向精神薬クロルプロマジンとその光反応産物による D-アミノ酸酸化酵素の活性阻害; 日本ビタミン学会第 58 回大会 (2006 年 5 月 徳島市)
 11. 川添僚也, 岩名沙奈恵, 小野公嗣, 朴 煥埼, 頼田和子, 津下英明, 福井 清: ヒト D-アミノ酸酸化酵素の構造および活性化機構への仮説モデル; 日本ビタミン学会第 58 回大会 (2006 年 5 月 徳島市)
 12. 頼田和子, 梅名泰史, 松岡 毅, 喜田昭子, 森本幸生, 福井 清: 結晶 X 線回折法による L-乳酸酸化酵素の活性中心の構造; 日本ビタミン学会第 58 回大会 (2006 年 5 月 徳島市)
 13. 小野公嗣, 朴 煥埼, 川添僚也, 岩名沙奈恵, 鄭 丞弼, Rabab Abou El-Magd, 富田優美子, 頼田和子, 福井 清: 脳内における D-アミノ酸酸化酵素の遺伝子発現; 第 47 回日本生化学会中四国支部例会 (2006 年 5 月 松江市)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
新規アポトーシス誘導タンパク質及びそれをコードする遺伝子」福井 清, 坂井隆志特願 2001-326784
 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, 海野麻未, 藤平隆久, 兼松宗太郎, 小柄渚, 窪田哲朗

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。第二年度までの研究から、高次脳機能の発達・発現・制御等に重要な役割を果たす NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDA 受容体）の生理的活性化に不可欠な、細胞外 D-セリンが、dsm-1(D-serine modulator-1)がコードする蛋白によって促進的調節を受け、脳局所の神経細胞の脱落やグリア細胞の活動性低下により有意に減少することがわかった。そこで、第三年度は、細胞外 D-セリン濃度の調節の分子細胞メカニズムをさらに検討するため、ラット内側前頭葉皮質において、1) グリア細胞に不可逆的変化を与える毒素による組織中 D-セリン濃度への影響、2)本研究で小脳失調に対する臨床試験を進めており、他の精神神経疾患の試験的治療にも応用されている、NMDA 受容体の部分的コ・アゴニストの D-サイクロセリンが細胞外 D-セリン濃度に及ぼす影響等を調べるとともに、3) 胎生または新生ラット大脳新皮質から培養したアストロサイトおよびニューロンにおける D-セリンの免疫組織学的・生化学的検討を行った。グリア細胞に対する不可逆的毒素の α -アミノアジピン酸を内側前頭葉皮質内に注入した 7 日後には、同部位の組織中 D-セリン濃度が有意に減少し、前頭葉皮質においては D-セリン濃度の維持、調節にグリア細胞が関与しているという昨年度までの結果が支持された。培養したアストロサイトおよびニューロンには、同程度の抗 D-セリン抗体に対する免疫反応性と、細胞ホモジネート中 D-セリン濃度が検出され、D-セリンがグリアとニューロンの双方に含有されることが示唆された。一方、D-サイクロセリンの腹腔内投与後、内側前頭葉皮質の細胞外 D-セリン濃度が増加し、L-セリン、グリシン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-アスパラギン、L-トレオニン、L-アラニン、L-アルギニン、タウリン等のアミノ酸濃度には変化が認められなかった。したがって、D-サイクロセリンは NMDA 受容体グリシン調節部位へのコアゴニストとしての直接作用の他に、細胞外 D-セリンシグナルを増強することを介しても、NMDA 受容体機能を促進し、治療効果を発揮する可能性がある。

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。

第二年度までの研究から、NMDA 受容体の生理的活性化に不可欠な、細胞外 D-セリンが、dsm-1(D-serine modulator-1)がコードする蛋白によって促進的調節を受け、脳局所の神経細胞の脱落やグリア細胞の活動性低下により有意に減少することがわかった。すなわち、高次脳機能障害の病態に細胞外 D-セリンの異常が関与することが強く示唆された。そこで、第三年度は、さらに細胞外 D-セリン濃度の調節の分子細胞メカニズムを検討する目的で、ラット内側前頭葉皮質において、1) グリア細胞に不可逆的变化を与える毒素による組織中 D-セリン濃度への影響、2)本研究で小脳失調に対する臨床試験を進めており、他の精神神経疾患の試験的治療にも応用されている、NMDA 受容体の部分的コ・アゴニストの D-サイクロセリンが細胞外 D-セリン濃度に及ぼす影響等を調べるとともに、3) 胎生または新生ラット大脳新皮質から培養したアストロサイトおよびニュー

ロンにおける D-セリンの免疫組織学的・生化学的検討を行った。

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

実験には、胎生 18〜20 日齢、および生後 1〜2 日または 50 日齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。D-サイクロセリンの全身的投与実験では、生後 50 日齢のラットを対象とし、50mg/kg および 100mg/kg (Sigma-Aldrich, Co. Ltd., St. Louis, USA) を腹腔内に注射した。

2. 細胞培養

(1)アストロサイトの培養

生後 2 日以内のラット大脳皮質からトリプシン処理により調製した細胞を 0.5×10^6 cells/cm² で 75cm² プラスチックフラスコに播種し、basal medium eagle complete (BMEC; fetal calf serum(FCS); 10%, NaH₂PO₄; 0.14 g/L, D-glucose; 0.59%, L-glutamine; 0.534 g/L, penicillin; 25 unit/mL, streptomycin; 25 μg/mL, basal medium eagle; BME) を培養液として、37°C, 5% CO₂ で 2 週間培養し、mixed glial cell culture とした。なお、培養液は 3 日おきに全量を交換した。10 から 14 日後に、培養液で 3 回洗いマイクログリアを除去し、260rpm で一晩振とうした後に 350rpm でさらに 30 分間振とうした。この上清を OPC として Type II アストロサイトの培養に、フラスコに接着している細胞を Type I アストロサイトの培養に用いた。接着した細胞はトリプシン処理により回収した。

上清はフラスコに移し、30rpm で 30 分間緩やかに振とうを行う事により、OPC 以外の細胞を接着させ除去した。さらにこの上清をポリエチレンイミンでコーティングした 24 穴プラスチックプレートに、 5.0×10^4 cells / cm² で播種し、10ng/mL PDGF を含む neurobasal medium (NBM+B27; B27

supplement; 2%, L-glutamine; penicillin; 25 unit/mL, streptomycin; 25 μ g/mL, 0.534 g/L)を用いて OPC を選択的に培養した。

上記2種の細胞は、24穴プラスチックプレートに10%FCSを含むDMEMg (Hepes; 25mM, pH 7.4, penicillin; 25 unit/mL, streptomycin; 25 μ g/mL, Dulbecco's modified essential medium-low glucose)を用いて、 3×10^4 cells/cm²で播種した。さらに、翌日と3日後にそれぞれの目的に応じた培養液に交換し、その3日後の培養上清と細胞を回収した。

(2)ニューロンの培養

胎生18または19日のラット大脳皮質を取り出し、パパイン処理により調整した細胞を、 2.5×10^5 cells/cm²でポリエチレンイミンコーティングした24穴プラスチックプレートに播種した。培養液はDMEMh+FCS/HS (FCS; 5%, horse serum; 5%, penicillin; 25 unit/mL, streptomycin; 25 μ g/mL, Dulbecco's modified essential medium-high glucose)を用いた。翌日と4日後にそれぞれの目的に応じた培養液に交換し、その3日後の培養上清と細胞を回収した。DMEMh+FCS/HSで培養したものは、アストロサイトと神経が存在する共培養系となり、NBM+B27に交換した場合は神経が優位に存在することが確認された。

3. 抗D-セリン抗体

KLH (keyhole limpet hemocyanine) にグルタルアルデヒドでD-セリンを架橋したものを抗原として、ウサギに免疫することにより、グルタルアルデヒドの架橋部分を含むD-セリンに特異的に反応する抗血清を得た。この抗血清(アフィニティカラムで精製)は、培養細胞の免疫染色に用いたD-セリンに反応する濃度ではグリシン、L-セリン、L-およびD-アラニン、L-およびD-システイン、D-スレオニン、D-アスパラギン酸等には反応しないことを確認した。

4. In vivo ダイアリス

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; 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。

5. 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。

6. 内側前頭葉皮質グリア細胞の選択的損傷

50日齢のラットに、シスチン-グルタミン酸アンチポーターを阻害することにより、グリア選択的毒性を発揮する α -アミノアジピン酸を、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、両側の内側前頭葉皮質を取り出しHPLC法により、組織中D-セリン濃度を定量した。

C. 研究結果

1. グリア毒の前頭葉組織中D-セリンに対する影響
 α -アミノアジピン酸を注入して7日後のラット内側前頭葉皮質内では、組織中D-セリン濃度

が有意に減少した(-13%)。しかし、L-セリン、グリシン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-アスパラギン、L-トレオニン、L-アラニン、L-アルギニン、タウリン等のアミノ酸濃度には変化が認められなかった。

2. D-サイクロセリンの前頭葉細胞外液中 D-セリンに対する影響

本研究課題において、小脳失調に対する臨床投与試験を進めている D-サイクロセリンは、D-セリンと化学構造上類似していることから、D-セリンシステムに影響する可能性が考えられる。そこで、全身的に D-サイクロセリンを投与し、内側前頭葉皮質の細胞外液中 D-セリンへの影響を投与後 160 分までの間検討した。予備的検討は第一年度に行ったが、本年度はその結果を参考に、用量の展開、動物数や分析対象とするアミノ酸の種類を増やす等を通じて詳細な解析を進めた。D-サイクロセリン 50mg/kg および 100mg/kg の腹腔内投与後、前頭葉皮質の細胞外 D-セリン濃度が用量にしたがって有意に増加し、それぞれ最大で基礎値の 138% および 174% に達した。これとは対照的に、L-セリン、グリシン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-アスパラギン、L-トレオニン、L-アラニン、L-アルギニン、タウリン等のアミノ酸濃度には有意な変化が認められなかった。

3. ラット大脳新皮質のグリアおよびニューロンの培養系における D-セリンの免疫組織化学的・生化学的検討

新生ラット大脳新皮質から、Type I および Type II アストロサイトを培養したところ、双方で抗 D-セリン抗体に対する軽度の免疫反応が検出された。また、胎生期ラット大脳新皮質から培養した、ニューロンが主体となる細胞系でも、上記のアストロサイトと同程度の D-セリン様免疫反応が観察された。さらに、これらの細胞のホモジネートでアミノ酸定量を行った結果、同様の濃度の D-セリンが検出された。この D-セリン濃度は、出生時ラットの大脳皮質と低濃度(50%未満)であることがわかった。

D. 考察

昨年度までの研究で、脳梗塞、神経変性疾患等で高次脳機能障害の基盤となる神経細胞損傷脳部位においては、ラット前頭葉神経細胞体の破壊実験より、D-セリンの細胞外液中および組織中濃度が著明に低下していることが明らかになり、D-セリンシグナル減少による NMDA 受容体機能不全が推測される。また、グリア細胞活動の急性低下によっても D-セリンシグナルが低下することが示唆されている。今年度は新たに、グリア細胞の不可逆的障害において前頭葉皮質組織中の D-セリンが選択的に低下することがわかった。さらに D-セリンは、大脳新皮質よりニューロンとアストロサイトを分離した状態で培養した条件下でも、双方に含まれることが免疫組織化学的ならびに定量的検討から示唆された。一方、高次脳機能障害の治療への導入を試みている D-サイクロセリンが、脳の細胞外 D-セリンを増加させることが見出された。

グリア細胞の不可逆的毒素の α -アミノアジピン酸を注入した脳局所で、脳内のアミノ酸のうち D-セリンに選択的な減少が引き起こされた点は、ニューロンとグリアの両方がともに D-セリンシグナル調節に重要であることを支持する新しい根拠と考えられる。特に D-セリンが強く影響される理由は明らかではないが、D-セリン代謝系が他のアミノ酸代謝系に比して、脳障害時の補償メカニズムが作動し難く、脆弱である可能性がある。したがって、薬物等により D-セリンシグナルを補強することは、脳局所の損傷にもとづく高次脳機能異常の治療法として意義があると推察される。

本研究課題で川井らが進めている D-サイクロセリンによる高次脳機能障害の改善の試みは、D-サイクロセリンが NMDA 受容体のグリシン調節部位に D-セリン様の作用を及ぼすことから、このような方向性に沿った治療戦略と言える。今年度の動物実験から、D-サイクロセリンには、従来知られていた上記の NMDA 受容体の部分的コアゴニストとしての作用する以外に、細胞外液中の D-セリンを増加させることによっても NMDA