

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

総合研究報告書

(平成 16～18 年度)

主任研究者 西川 徹

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧 27

I. 総合研究報告

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た。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。

基礎的研究では、主任研究者らが検出した、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選択的に抑制する dsm-1 の解析を行い、1) 双方とも mRNA が D-セリン及び NMDA 受容体と類似した分布を示すこと、2) dsr-2 はゲノム上、NMDA 受容体制御に関わる neurexin3 α 遺伝子の反対鎖にコードされ、3) Dsm-1 蛋白は D-セリンの細胞外放出促進すること等を見出した。In vivo における D-セリンの細胞外放出が、1)ニューロンおよびグリアの双方より制御を受け、2)DCS によって増加する、等の新知見も得られた。大脳皮質由来培養細胞系では、アストロサイトおよびニューロンに、同程度の D-セリン様免疫反応と D-セリン濃度が検出され、D-セリンの代謝や機能に、グリアとニューロンが共に重要である可能性が支持された。また、D-セリン分解活性をもつヒト D-アミノ酸酸化酵素(DAO)について、過剰な D-セリンがグリア系培養細胞を傷害する過程への関与や向精神薬の影響を明らかにし、結晶化に成功した。以上の分子は D-セリン—NMDA 受容体シグナルを調節する可能性があり、高次脳機能障害治療薬開発の標的や候補物質としての意義を検討中である。さらに、高次脳機能障害を引き起こす大脳皮質局所の損傷のモデルを、動物の前頭葉皮質に神経毒またはグリア毒を注入して作製したところ、損傷を受けた大脳皮質の細胞外あるいは組織中の D-セリンが減少することがわかり、高次脳機能障害の病態に D-セリンシグナルの低下が関与することが推測された。

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、有害事象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

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、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こ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解明を試みた。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した。

この目標を達成するため、主任研究者のほか、2名の分担研究者を加え、基礎的・臨床的双方の観点から、相互に関連した研究が進展するよう、分担研究課題を設定して研究を進めた。すなわち、中心となる研究テーマとして、(1) 脳の D-セリンの代謝・機能の分子機構に関する研究、(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、(3) 小脳失調に対する D-セリン様作用をもつ

D-サイクロセリンの効果に関する研究の、3課題を選んだ。

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。臨床試験においては、対象者に試験内容、危険性の排除、参加取りやめの自由と不利益がないこと、個人情報保護されること等を十分説明し、本人より書面による同意を得た。

各研究方法を以下に示す。

(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、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、dsr-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. 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. 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を、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。

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 (300×3.9mm, 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. 内側前頭葉皮質神経細胞体またはグリア細胞の選択的損傷

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、またはシスチン-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。キノリン酸注入群では、手術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。 α -アミノアジピン酸注入群では、手術1週間後に内側前頭葉皮質を取り出し、ホモジナイズ・除蛋白した後、アミノ酸濃度を測定した。

9. 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。

10. 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 μ g/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。

(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 / 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。

11. 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。

(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. 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、*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が、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、dsm-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。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. 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、全長の cDNA の解析を行った。

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

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。

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- α -アミノアジピン酸を、ダイアリシスチュ

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。

5. 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。

6. 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。

7. D-サイクロセリンの脳内 D-セリン代謝に及ぼす影響

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ため、D-セリン代謝に影響する可能性について、ラットを用いて検討した。D-サイクロセリン 100mg/kg をラットの腹腔内に投与すると大脳新皮質内の組織中の D-セリン濃度が有意に上昇した。また、in vitro で、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 D-サイクロセリンが抑制することが明らかにな

った。

一方、D-サイクロセリン 50mg/kg および 100mg/kg を腹腔内投与したラットにおいて、内側前頭葉皮質の細胞外液中D-セリンの変化を投与後 160 分までの間観察したところ、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。

8. 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。

新生ラット脳から初代グリア分離培養を行い、Type I アストロサイトにおける DAO 遺伝子の発現を見出したことをもとに、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や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って抑制された。

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。

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。

本研究では、ヒト DAO 酵素の結晶化にも成功した。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。

(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-サイクロセリンの脊髄小脳変性症患者に対する二重盲検クロスオーバー投与試験においては、50mg 投与群は年齢 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、CCA 2 例、MJD 2 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ので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。

二重盲検試験が終了した症例のうち希望があった 8 例で一日 50 mg 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。

以上の二重盲検試験およびその後の長期投与試験のいずれにおいても、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、有害事象のため試験を中止した例はなかった。

D. 考察

本研究は、三年間の研究期間を通じて、細胞外 D-セリンの調節を中心に、脳内 D-セリンシステムの分子細胞機構とその病態の解明に有用な知見をもたらしたと考えられる。また、高次脳機能障害治療法開発の基礎となる所見を蓄積した。

(1) 脳の D-セリンの代謝・機能の分子機構に

関する研究

主任研究者らの研究から、NMDA 受容体機能を規定する細胞外液中 D-セリン濃度の調節について、グリアとニューロンの両方が関わるが、それぞれの活動変化の影響が大きく異なることが、*in vivo* で初めて明らかになった。従来海外で進められてきた、細胞外 D-セリン濃度に関する実験は、脳スライスや培養細胞等の *in vitro* 系において、人工的に D-セリンを負荷した状態で行われたため、生理的な動態を知ることが難しく、研究者間の不一致も多く認められた。本研究は、*in vivo* ダイアリシス法により、生理的条件に近い状態で細胞外 D-セリンの動態を調べ、*in vitro* 実験での問題点を克服しつつあるといえる。

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。本研究では、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および組織中の D-セリン濃度が変化することが明らかになった。すなわち、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。グリア選択的な可逆的毒性をもつことが報告されている、フルオロクエン酸の急性灌流によっても、内側前頭葉皮質の細胞外 D-セリン濃度を低下した。不可逆的グリア毒の L- α -アミノアジピン酸は同部位で、軽度ながら、急性灌流時には細胞外液中 D-セリン濃度を、局所注入後 1 週間では組織中 D-セリン濃度を有意に減少させた。以上の結果は、組織中および細胞外液中の D-セリン濃度の制御にニューロンとグリアの双方が関与することを支持している。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、ニューロンやグリアの損傷後の 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ことが示唆された。したがって、本研究のように D-セリンシグナルを増強するような、高次

脳機能障害に対する治療法を開発する戦略は妥当と考えられる。

興味深いことに、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。

一方、ラット大脳新皮質から、主任研究者らが 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。*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。

D-セリンの代謝・機能に関係する分子の候補として、*differential cloning* 法によって検出された *dsr-2* は、その 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、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。さらに、DNA アレイを用いた実験により、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。*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。

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、ニューロンやグリアの種類別に、発現している D-セリン代謝関連分子を同定し、どのようにして D-セリンシグナルの調節に関係するのかを明らかに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いう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

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。

本研究で観察された C6 グリオーマ細胞および大脳皮質由来のグリア細胞の死は、D-セリンの DAO 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、統合失調症の治療に使用されるクロルプロマジンが DAO 活性を阻害する作用は、DAO 欠損マウスにおいて組織中 D-セリン濃度が上昇することや、D-セリンが統合失調症状を改善することが報告されていることを考え合わせると、高次脳機能障害の治療にも役立つ可能性がある。

ヒト DAO の結晶化により、ヒト DAO 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。DAO は D-セリンシグナル増強薬開発の標的候補分子のひとつであり、これらの所見は、DAO 上の薬物作用点を見出す上でも有用と推測される。

(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

今回の検討では、脊髄小脳変性症 (SCD) 患者への短期投与では 50mg と 100mg 投与群には差はみられなかったため 50mg 投与で実

際上十分であると推測されうる。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。注目すべきなのは歩行時間では実薬のみ改善傾向を認めている点で、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。

また長期投与試験では、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。いずれの患者においても、運動失調に対する改善効果は、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。

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で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。

一方サイクロセリンは、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。

本研究における、短期の二重盲検試験および長期投与試験でも、有害事象は認められなかった。したがって、今後、D-サイクロセリンの用量設定の方法や有効症例の特徴についても明らかにするため、本剤の SCD に対する効果の検討を継続する意義があると考えられる。

E. 結論

本課題の三年間の研究期間中に、各研究者間で相互に関係した基礎的ならびに臨床的研究が発展し、脳の D-セリンシステムから見た、高次脳機能障害の病態解明と治療法開発に貢献しうる、多くの新知見が得られた。

(1)D-セリンの代謝・機能に、dsr-2、dsm-1、

が重要な役割を果たす可能性があることや、*in vivo*で脳内細胞外D-セリン濃度を上昇させる物質を見出し、ヒトD-アミノ酸酸化酵素を結晶化・X線解析したこと等により、D-セリンシグナル調節薬開発の標的と候補物質の有用な手がかりを得た。

(2)高次脳機能障害の基盤となる、大脳皮質局所または培養系のニューロンおよびグリア細胞の障害のモデルにおいてD-セリン濃度の異常やD-アミノ酸酸化酵素が関与すること初めて示した。

(3)DCSの脊髄小脳変性症に対する治療効果を検証する二重盲検試験と、一部希望患者への長期投与を世界で初めて実施した。有害事象は出現せず、小脳失調の改善が認められたが、改善の程度は小さく、偽薬効果との差異を今後検討する必要がある。

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.
12. 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.
13. 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.
14. Nishikawa T. Metabolism and Functional Roles of Endogenous D-Serine in Mammalian Brains. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:1561-1565.
15. 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* 2006; 139: 295-304.
16. 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; 2005: 853-860.
17. 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* 2005; 29: 61-62.
18. 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; 2005: 33-36.
19. 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; 2005: 861-866.
20. 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* 2005; 61: 439-441.
21. 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; 2005: 43-48.
22. K. Yorita, T. Matsuoka, D. P. Ballou, K. Fukui: H265Q L-Lactate Oxidase from *Aerococcus viridans*. *Flavins and Flavoproteins* 2005; 2005: 37-41.
23. 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* 2005; 41: 857-861.
24. 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* 2005; 18: 537-550.
25. 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 2005; 45: 117-120.
26. 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 2005; 45: 287-292.
 27. 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 2005; 59: 482-485,
 28. 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 2005; 60: 112-118, 2006.
 29. 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*, 2005; 15: 587-593.
 30. 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* 2004; 20: 2909-2916.
 31. 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* 2004; 90: 1378-1388.
 32. 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/Pro-caspase-9 Complex for the Induction of Stress-Induced Apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 41131-41140.
 33. 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* 2004; 380: 31-41.
 34. 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-アミノ酸化酵素の役割 ---. 化学と生物 2004; 42: 426-428.
 35. 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* 2004; 52: 151-155.
 36. 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* 2004; 62: 2209-2213.
 37. 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 2004; 21: 175-181.
 38. 山本敏之, 菊池猛, 永江順子, 尾方克久, 小川雅文, 川井充: ディスプロン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 2004; 44: 28-33.
 39. 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 2004; 44: 268-273.
 40. 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 2004; 44: 286-290.
41. 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 2004; 44: 417-421.
 42. 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 2004; 56: 873-876.
 43. 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さを検討. 臨床神経 2005; 45: 117-120.
- (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.
 4. 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.
 5. 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. 南江堂, 東京, 2006. pp. 264-266.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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, pp. 270-275, 2004.
 9. 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. 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.
8. 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.
 9. 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 2005; 51: 1-8.
 10. 川井充: 筋ジストロフィーの心筋障害- 一序論. 神経内科 2005; 62: 525-529.
 11. 川井充: 神経疾患における患者の訴え. 診断と治療 2005; 93: 18-22, 2005.
 12. 川井充: 骨格筋量の測定. Annual Review 神経 2005; 27-33.
 13. 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. Clin Neurosci 23: 106-107, 2005.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
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))
 8. 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))
 9. 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: 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的応答を示す遺伝子 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用薬」, 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.
 15. 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.
 16. 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
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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