

「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」

平成 21 年度採択研究代表者

西川 徹

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授

統合失調症のシナプスグリア系病態の評価・修復法創出

§1. 研究実施の概要

本研究では、D-セリンをグリアニューロン相互シグナル分子とする、グルタミン酸(Glu)シナプスの分子細胞機構と統合失調症における病態を解明し、その評価・修復法を創出する基礎的研究と、本シナプスに影響する既認可薬 D-サイクロセリンを用いた本症の難治症状の治療試験を行う臨床的研究を、有機的に結びつけつつ推進している。今年度は、基礎的研究として、D-セリンの代謝・Glu シナプスグリア機能連携の分子細胞機構の解析と、このために必要な遺伝子改変動物の作製を継続し、関連する未知分子や既知分子の新たな相互作用および病態の検索が進展した。臨床面では、治療試験の倫理的手続・評価指標の更なる充実をはかり、脳画像・生理学的検査の対照群におけるデータ集積を行うとともに、患者への薬物投与を開始した。

§2. 研究実施体制

(1)「西川」グループ(東京医科歯科大学)

① 研究分担グループ長:西川 徹 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科、教授)

② 研究項目

シナプスグリア-D-セリン系の分子機構解明と統合失調症における病態解析および修復法創出

(2)「福井」グループ(徳島大学)

① 研究分担グループ長:福井 清 (徳島大学疾患酵素学研究センター、教授)

② 研究項目: D-アミノ酸酸化酵素によるシナプスグリア機能調節と統合失調症における病態の解析

(3)「田中」グループ(東京医科歯科大学)

- ①研究分担グループ長:田中 光一(東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究部、教授)
- ②研究項目:シナプス-グリア機能連携の分子機構と D-セリンシおよびグルタミン酸シグナルの役割の解明

(4)「有馬」グループ(国立精神・神経医療研究センター)

- ①研究分担グループ長:有馬 邦正((独)国立精神・神経医療研究センター病院、部長)
- ②研究項目:統合失調症のシナプス-グリア-D-セリン系病態の薬物治療試験および死後脳における解析

(5)「大森」グループ(徳島大学)

- ①研究分担グループ長:大森哲郎(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部、教授)
- ②研究項目
シナプス-グリア-D-セリン系作用薬の統合失調症治療効果とその生物学的指標の解析

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

本課題では、D-セリンをグリア-ニューロン相互シグナル分子とする、グルタミン酸(Glu)シナプスの分子細胞機構と統合失調症における病態を解明し、その評価・修復法を創出することを目指している。平成 21 年度に開始した基礎的・臨床的研究を継続し、前者では、D-セリンの分解系の細胞局在・細胞外液中濃度調節等に新知見が得られるとともに、yeast-two-hybrid 法・DNA アレイ法等を導入して、D-セリン-グリア-Glu シナプスに関係する未知分子や新たな相互作用分子を見出した。また、今後の詳細な解析に必要な、D-セリンのシナプスにおける動態に関与する分子・細胞を変化させる遺伝子改変動物の作製が進展した。さらに、臨床的研究では、D-サイクロセリンのクロスオーバー二重盲検投与試験と、統合失調症の生物学的評価を目的とした検査の拡充、ならびに比較のための健常対照者におけるデータ集積が始まった。

【1】基礎的研究

(i) D-セリンの合成・放出・取込の分子細胞機構解明および統合失調症との関連性の検討

D-セリンはNMDA型Glu受容体のコアゴニスト(単独では本受容体を活性化しないがアゴニストが効果を発揮するのに不可欠)として作用することから、細胞外D-セリンシグナルはGluシナプスが生理的に機能するのに不可欠な役割を果たすと考えられるが、その調節の分子細胞機構は未解明の部分が多い。今年度は、研究代表者らが予備的な実験から見出していた、GABA伝達系が細胞外D-セリン濃度に影響を与える現象をin vivoで詳細に解析し、ラット前頭葉皮質では、(1)

GABAA \sim C受容体3タイプのうちGABAA受容体が選択的にD-セリンの細胞外放出をtonicに抑制している、(2) GABAA受容体遮断による細胞外D-セリンの低下はNMDA受容体のphasicな細胞外タウリン放出促進機能を阻害し、この効果は外来性D-セリン添加により回復する、(3)神経細胞体選択的毒素によりGABA性介在ニューロンを破壊しておくことと細胞外D-セリン濃度が低下する等が明らかになった。これらの所見から、哺乳類の前頭葉においてGABAA受容体によるD-セリンシグナル制御がNMDA受容体機能調節に関与することが示唆された。

さらに、AMPA型Glu受容体や、NMDA受容体およびAMPA受容体の機能調節に重要な亜鉛イオンによるD-セリン放出の制御についても、in vivoにおける解析を開始した。統合失調症では、大脳皮質のNMDA受容体—D-セリン系の機能不全やGABA伝達系およびGlu伝達系との相互作用の障害が指摘されていることから、上記GABAA受容体性D-セリン制御が変化している可能性があり、今後検討する予定である。

また、生理的D-セリン放出細胞とその分子カスケードを調べるため、D-セリン遊離に関係するdsm-1遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス、および特定グリア細胞を蛍光標識あるいは破壊するためのトランス下ニックマウスの作製が進展した。さらに、ラット脳の切片や大脳新皮質から調整した初代培養系のニューロンおよび種々のグリアにおいて、細胞内および培養液中のD-セリン濃度に影響する物質やD-セリン様免疫反応性の検討を継続した。

(ii) D-セリンの分解系の分子細胞機構の解明と統合失調症における病態の解析

D-セリンの分解活性をもつD-アミノ酸酸化酵素(DAO)の病態生理学的意義の解明を目的として、種々の細胞におけるDAO活性とDAOによるD-セリン分解の産物の作用の関係を検討した。その結果、D-セリン代謝産物の過酸化水素とともに β -ヒドロキシピルビン酸(HPA)も細胞死誘導活性を有することが明らかとなった。また、過剰なD-セリンの細胞毒性は、通常の条件で培養したC6グリオーマ細胞(アストログリア系)よりDAOを強制発現させたC6グリオーマ細胞の方が低濃度で出現し、HPAによる細胞死はグリア細胞に顕著でアポトーシスの一形態であることがわかった。以上の結果から、脳内D-セリンがアストログリア細胞のDAOによって分解される、過剰なD-セリンにより惹起される細胞死に H_2O_2 とともにHPAが関与する、HPA誘導性細胞死がグリア細胞特異的に生ずる、等の可能性が示唆された(\$4-1-3, \$4-1-4)。

(iii) 統合失調症の病態修復のためのD-セリンシグナル調整薬およびその標的分子検索

新しい統合失調症治療薬開発を目指して、その病態を修復するD-セリンシグナル調整法と標的分子の手がかりを得るため、D-セリンの代謝に重要な未知分子を網羅的に検索した。すなわち、脳内D-セリン濃度を増加させたラットの大脳新皮質や、種々初代培養脳細胞(グリア、ニューロン)を用いてDNAアレイ解析を行い、従来報告のなかったD-セリン選択的応答を示す遺伝子群を検出するとともに、D-セリン含有量が高い培養細胞に発現する遺伝子のプロファイルを明らかにした。

(iv) シナプスグリア—D-セリン—グルタミン酸機能連携の分子細胞機構および統合失調症における病態の解明

グルタミン酸(Glu)トランスポーターGLT1およびGlu受容体NR2Dは、ヒトゲノム解析、死後脳の遺伝子発現解析、遺伝子改変動物の行動解析等の研究から、統合失調症との関連が報告され

ていることから、これらの活性制御因子は、統合失調症の感受性遺伝子の候補となるだけでなく、新しい治療薬の標的となりうる。そこで、こうした分子を yeast-two-hybrid 法により検索し、それぞれ 18 個、700 個の候補遺伝子を同定した。後者は、他のスクリーニング系の結果と合わせて、さらに 17 個に絞り込んだ。また、統合失調症の two hit model に基づいたモデル動物を得るため、時期特異的に GLT1 を欠損できるマウスの作製を開始した。一方、統合失調症における障害部位の一つとして注目される小脳の Glu シナプス伝達は、Glu トランスポーター EAAT4 の発現量により、2つのドメインに分かれることが明らかになり、NR2D はじめ小脳の死後脳組織における Glu 伝達関連分子の解析は、各ドメイン単位で行う必要があることが示唆された。

【2】臨床的研究

(i) NMDA受容体—D-セリン系に作用する既認可薬を用いた統合失調症の臨床治療試験

Gluシナプス—グリア系調節候補薬として、NMDA受容体—D-セリン系に作用する既認可薬D-サイクロセリンを用いた、統合失調症の難治性症状に対する臨床治療試験への患者エントリーを開始した。これらの患者ならびに、本試験のデータとの比較評価を行うのに必要な、入院・外来における、臨床試験参加者以外の統合失調症患者、および気分障害・不安障害等の統合失調症以外の患者(疾患対照群)、または健常者(対照群)について、次のように、シナプス—グリア系病態を反映すると考えられる心理学的・神経学的評価ならびに生物学的指標の計測を進めた。すなわち、統合失調症の陽性・陰性症状評価尺度、認知機能簡易評価尺度(Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia, BACS)、核磁気共鳴(MR)画像(MRI)による脳形態・拡散強調画像計測、近赤外線スペクトロスコピー(NIRS)装置による脳血流計測、MR spectroscopy (MRS)による脳内GABA濃度の定量、遺伝子多型解析等を行っている。

(i) 統合失調症のシナプス—グリア系病態の評価法に関する臨床的検討

BACSにより61名の統合失調症患者の認知機能を評価し、認知機能は、錐体外路症状の影響を受け、陰性症状との関連が認められることや、主観的 QOL とは関連しないが客観的 QOL と正の相関があり、特に注意と情報処理の領域で顕著であることがわかった(文献7 (\$4-1))。有馬グループでは、BACSに加え、さらに詳細な標準的認知機能評価尺度のMCCB (MATRICS 統合失調症認知機能評価尺度)の日本語版 MCCB-J を評価項目に加える準備を進めた。

MR の Diffusion Tensor Imaging による解析では、健常対照者の解析が十分進展するよう、協力施設数を増やした。有馬グループでは、MR の Arterial Spin Labeling 法の準備も行った。MRS 研究においては、大森グループが統合失調症患者・健常者の被験者数を増加し、昨年度までに認められた、前部帯状回 GABA 濃度と抗精神薬用量と負の相関、および左基底核 GABA 濃度と抗コリン薬用量の正の相関を追認した。これらの結果は動物実験データとも符合し、患者脳における GABA 定量が機能的意味をもつことが示唆された。また、有馬グループでも測定準備を始めた。NIRS 検査は、西川・有馬のグループにおいて、統合失調症患者、気分障害患者、または健常者を対象として行い、それぞれ、50 名以上、50 名以上、60 名以上の協力得た。

一方、統合失調症との関連が注目されている pericentrin (PCNT) 遺伝子多型の解析を行ったが、統合失調症と有意な関連は見られなかった(文献6 (\$4-1))。

(iii)統合失調症病態解析のための研究リソース整備

統合失調症におけるシナプスグリア系の病態および治療試験の指標のうち、遺伝子多型、MRI 画像、NIRS 画像、MRS 解析、心理学的検査成績等について、上記(i)および(ii)に記した検討から得られたデータの蓄積を開始した。また、死後脳解析の準備として国立精神・神経医療・研究センターが運営する剖検脳ネットワークの Research Resource Network に凍結保存されている死後脳サンプルから、保存状態のよいものを選定した。同センター病院では、平成 22 年は新規の剖検例がなかったが、Research Resource Network では、4 例の統合失調症脳の新規剖検があった。DNA マイクロアレイ等の動物実験データも、他の検討に活用できるよう整理した。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Rabab M. Abou El-Magd, Hwan Ki Park, Tomoya Kawazoe, Sanae Iwana, Koji Ono, Seong Pil Chung, Motoshige Miyano, Kazuko Yorita, Takashi Sakai, Kiyoshi Fukui “The Effect of Risperidone on D-Amino Acid Oxidase Activity as a Hypothesis for a Novel Mechanism of Action in the Treatment of Schizophrenia” *Journal of Psychopharmacology* vol. 24, No.7, pp.1055-1067, 2010 (DOI: 10.1177/0269881109102644)
2. Tran Hoang Nam, Takashi Sakai, Sun Mi Kim, Kiyoshi Fukui “NF-kappaB regulates the expression of Nucling, a novel apoptosis regulator, with involvement of proteasome and caspase for its degradation” *Journal of Biochemistry* vol. 148, No. 5, pp.573-580, 2010 (DOI: 10.1093/jb/mvq089)
3. Rabab M. Abou El-Magd, Chizuru Sasaki, Tomoya Kawazoe, Salah Mohamed El-Sayed, Kazuko Yorita, Yuji Shishido, Takashi Sakai, Yoshitoshi Nakamura, Kiyoshi Fukui “Bioprocess development of the production of the mutant P-219-L human D-amino acid oxidase for high soluble fraction expression in recombinant *Escherichia coli*” *Biochemical Engineering Journal* vol. 52, No. 2-3, pp.236-247, 2010 (DOI: 10.1016/j.bej.2010.08.016)
4. Seong Pil Chung, Kimiko Sogabe, Hwan Ki Park, Ying Song, Koji Ono, Rabab M. Abou El-Magd, Yuji Shishido, Kazuko Yorita, Takashi Sakai, Kiyoshi Fukui “Potential cytotoxic effect of hydroxypyruvate produced from D-serine by astroglial D-amino acid oxidase” *Journal of Biochemistry* vol. 148, No. 6, pp.743-753, 2010 (DOI: 10.1093/jb/mvq112)
5. Paukert, M., Huang, Y.H., Tanaka, K., Rothstein, J.D., Bergles, D.E. Zones of

- enhanced glutamate release from climbing fibers in the mammalian cerebellum. *J Neurosci* 30. 7290-7299, 2010 (doi: 10.1523/JNEUROSCI.5118-09.26).
6. Numata S, Nakataki M, Iga J, Tanahashi T, Nakadoi Y, Ohi K, Hashimoto R, Takeda M, Itakura M, Ueno S, Ohmori T. Association study between the pericentrin (PCNT) gene and schizophrenia. *Neuromolecular Med.* Sep;12(3):243-247. 2010 (DOI: 10.1007/s12017-009-8106-x)
 7. Ueoka Y, Tomotake M, Tanaka T, Kaneda Y, Taniguchi K, Nakataki M, Numata S, Tayoshi S, Yamauchi K, Sumitani S, Ohmori T, Ueno SI, Ohmori T. Quality of life and cognitive dysfunction in people with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* Sep 8. 2010 [Epub ahead of print]PMID: 20804809 [PubMed - as supplied by publisher]Related citations (DOI: 10.1016/j.pnpbp.2010.08.018)

(4-2) 知財出願

- ①平成22年度特許出願件数(国内 0件)
- ②CREST 研究期間累積件数(国内 0件)