

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590258
 研究課題名 (和文) RNA 干渉を用いた D-セリン代謝酵素の機能解析と統合失調症治療への応用
 研究課題名 (英文) Functional analysis of D-serine-metabolizing enzymes using RNA interference: Application to treatment of schizophrenia
 研究代表者
 橋本 篤司 (HASHIMOTO ATSUSHI)
 東海大学・医学部・准教授
 研究者番号：80271592

研究成果の概要：

本研究では、セリンラセマーゼ (SR) に対する siRNA を用いて SR ノックダウンラットの作出及び SR ノックアウト (KO) マウスを用いて SR の機能解析を行う。ラット脳内に SR に対する siRNA を投与したが、mRNA 及び D-セリン含量に有意な差はみられなかった。一方、SR-KO マウスの大脳皮質 D-セリン含量は正常マウスの約 5% に減少していることが明らかになった。今後は、この KO マウスを用いて分子生物学的・行動学的、及び薬理的な研究を行い、SR の脳内における機能及び統合失調症との関連を解析していく予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：D-セリン、セリンラセマーゼ、統合失調症

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、陽性症状(幻覚・妄想)、陰性症状(感情鈍麻・意欲の低下)及び認知障害が認められる疾患である。生涯罹患率は約 1% と発症頻度は高く、50% の患者が 1 度は自殺を試み、15% の患者が自殺で亡くなる。遺伝と環境の両方の要因によって統合失調症が発症すると考えられているが、発症機序

が複雑であるため病因ははまだ解明されていない。さらに、日本の精神科病床 32 万床の約 60% を統合失調症患者が占めていることや現在の治療薬では統合失調症の難治性症状(陰性症状・認知障害)を完全に抑えることはできないことから、適切な病態モデル動物を用いた基礎的研究や新規治療薬の開発が切望されている。

2. 研究の目的

ヒトに統合失調症様症状を引き起こすフェンシクリジン(PCP)、ケタミン、及びMK-801がN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型グルタミン酸受容体を強力に遮断することから、統合失調症の病態仮説として「NMDA受容体機能低下仮説」が提唱されている。申請者らは、哺乳類脳内に遊離型D-セリンが多量存在することを初めて明らかにした。また、D-セリンがNMDA受容体グリシン結合部位の選択的アゴニストであることから、D-セリンがNMDA受容体グリシン結合部位の内在性調節物質であることを提唱した(Hashimoto & Oka, Prog. Neurobiol., 1997)。近年、SnyderらはL-セリンをD-セリンにラセミ化するセリンラセマーゼ(SRR)をクローニングした。また、Chumakovらはゲノム解析によりD-セリンを代謝するD-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)が統合失調症の疾患感受性遺伝子であることを報告した。さらに、統合失調症患者の脳脊髄液中D-セリン濃度が低下していること及びD-セリン投与によって統合失調症患者の陰性症状・認知障害が改善することなどの知見は、D-セリンが統合失調症の病因と関連していることを示唆するとともに、統合失調症の「NMDA受容体機能低下仮説」を強く支持している。本研究ではD-セリンの生合成酵素であるSRRに対するsiRNAを用いてノックダウンラットを作成し、D-セリン代謝酵素の機能解析を行う。最近、森寿教授(富山大学)は世界に先駆けてSRRノックアウト(KO)マウスの作出に初めて成功したことから、このノックアウトマウスを用いて分子生物学的・行動学的、薬理的及び組織化学的な研究を行い、SRRの脳内における機能及び統合失調症との関連を解析する。

本研究によって新規統合失調症モデル動

物の作成やD-セリン代謝酵素の病態生理学的意義の解明がなされれば、難治性統合失調症の陰性・認知症状に対して有効な新規治療薬開発の基盤研究となる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) SRRに対するsiRNAを用いた細胞レベルでの解析

SRRに対して特異的な数種類のsiRNA及びネガティブコントロールsiRNAを設計し、化学合成する(Dharmacon Research Inc.)。jetSIあるいはin vivo jetPEIを用いて、siRNAを初代培養神経細胞またはグリア細胞に導入する。導入後48、72時間後に、PCR法、In situ hybridization法、免疫組織化学法、及びWestern法を用いてmRNA及び蛋白質の発現抑制を確認する。トランスフェクション試薬量、siRNA量、細胞密度、培養時間などを詳細に検討する。ポジティブコントロールとして内在性ハウスキーピング遺伝子であるLaminに対するsiRNAをjetSIあるいはin vivo jetPEIを用いて導入し、72時間後に免疫蛍光染色法でLamin蛋白質の発現抑制を確認する。また、jetSI-Fluo(jetSI, FITC Conjugate)を用いてsiRNAを神経細胞あるいはグリア細胞へ導入し、72時間後に免疫蛍光染色法で導入効率及び細胞内分布を確認する。in vivo jetPEI及びjetSIを用いてsiRNAがうまく導入できない場合は、NeuroPORTER Transfection Reagent(陽イオン性脂質をベースにした新しい試薬で神経細胞に効率的かつ簡便にsiRNAやDNAを導入できる: Gene Therapy Systems, Inc.)を用いて再検討する。

(2) SRRに対するsiRNAを用いた個体レベルでの解析

in vitro系で用いたsiRNAの中から遺伝

子発現抑制が強い siRNA を選択し、ラット脳内（脳室内、大脳皮質、海馬など）に jetSI あるいは in vivo jetPEI を用いて siRNA を導入する。導入後 24-72 時間後に、PCR 法、In situ hybridization 法、免疫組織化学法、及び Western 法を用いて各脳部位における mRNA 及び蛋白質の発現抑制を確認する。トランスフェクション試薬量、siRNA 量、投与部位、導入後時間などを詳細に検討する。in vivo jetPEI 及び jetSI を用いて siRNA がうまく導入できない場合は、NeuroPORTER Transfection Reagent (Gene Therapy Systems, Inc.) あるいはエレクトロポレーション法を用いて再検討する。

(3) SRR-KO マウスにおける D-セリン関連遺伝子 (SRR, DAO, NMDA 受容体, ドパミン受容体など) の発現変化解析

野生型及び SRR-KO マウスにおける mRNA 及び蛋白質の発現変化を RT-PCR 法、In situ hybridization (ISH) 法、及び免疫組織化学法を用いて解析する。また、本実験では野生型及び SRR-KO マウスに MK-801 (NMDA 受容体アンタゴニスト)、メタンフェタミン(覚せい剤)、あるいは抗精神病薬(ハロペリドール、リスペリドン、オランザピンなど)を腹腔内投与し、RT-PCR 法によって遺伝子発現の変化を解析する。

(4) 統合失調症の新規モデル動物としての評価

SRR-KO マウスの自発運動量、薬物誘発性異常行動(MK-801, メタンフェタミン)、抗精神病薬(ハロペリドール、リスペリドン、オランザピンなど)の影響、prepulse inhibition、及びD-セリン濃度測定などの解析を行い、新規統合失調症モデル動物としての評価を行う。

4. 研究成果

初代培養神経細胞及びラット脳内に SRR に対する siRNA を投与したが、mRNA 及び D-セリン含量に有意な差はみられなかった。今後は、siRNA の投与量、投与回数、投与後時間、及び他のトランスフェクション試薬等の検討を行っていく予定である。一方、SRR-KO マウスの大脳皮質 D-セリン含量はコントロールマウスの約 5% に減少していることが明らかになった。また、SRR-KO マウスを用いた D-セリン関連遺伝子 (SRR, DAO, NMDA 受容体, ドパミン受容体など) の発現に対する MK-801 の影響及び行動に対する MK-801 とメタンフェタミンの影響に関しては現在検討中である。今後は、SRR-KO マウスを用いて分子生物学的・行動学的、薬理的及び組織化学的な研究を行い、SRR の脳内における機能及び統合失調症との関連を解析していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Hashimoto A., Konno R., Yano H., Yoshikawa M., Tamaki R., Matsumoto H., Kobayashi H., Mice lacking D-amino acid oxidase activity exhibit marked reduction of methamphetamine -induced stereotypy. Eur. J. Pharmacol. 586: 221-225, 2008, 査読有

② Yoshikawa M., Shinomiya T., Takayasu N., Tsukamoto, H., Kawaguchi M., Kobayashi M., Oka, T., Hashimoto, A., Long-term treatment with morphine increases the D-serine content in the rat brain by regulating the mRNA and protein expressions of serine racemase and D-amino acid oxidase. J. Pharmacol. Sci. 107: 270-276, 2008, 査読有

③ Ito K., Yoshikawa M., Maeda M., Jin X. L., Takahashi S., Matsuda M., Tamaki R., Kobayashi H., Suzuki T., Hashimoto A., Midazolam attenuates the antinociception induced by D-serine or

morphine at the supraspinal level in rats. Eur. J. Pharmacol. 586: 139-144, 2008, 査読有

④ Yoshikawa M., Ito K., Maeda M., Akahori K., Takahashi S., Jin X.L., Matsuda M., Suzuki T., Oka T., Kobayashi H., Hashimoto A., Activation of supraspinal NMDA receptors by both D-serine alone or in combination with morphine leads to the potentiation of antinociception in tail-flick. Eur. J. Pharmacol. 565: 89-97, 2007, 査読有

⑤ Yoshikawa M., Takayasu N., Hashimoto A., Sato Y., Tamaki R., Tsukamoto H., Kobayashi H., Noda S., The serine racemase mRNA is predominantly expressed in rat brain neurons. Arch. Histol. Cytol. 70: 127-134, 2007, 査読有

⑥ Hashimoto A., Yoshikawa M., Andoh H., Yano H., Matsumoto H., Kawaguchi M., Oka T., Kobayashi H., Effects of MK-801 on the expression of serine racemase and D-amino acid oxidase mRNAs and on the D-serine levels in rat brain. Eur. J. Pharmacol. 555: 17-22, 2007, 査読有

〔学会発表〕（計3件）

① 渡邊真理子、吉川正信、竹山和秀、村田智彦、金幸祿、小林智美、橋本篤司、小林広幸、鈴木利保、ケタミン長期投与によるD-セリン代謝酵素遺伝子発現の変化、第82回日本薬理学会年会、横浜、2009

② 吉川正信、四宮敬史、小林智美、赤堀一仁、橋本篤司、小林広幸、川口充、D-セリン関連タンパク質のmRNAは唾液腺において発現する、第81回日本薬理学会年会、横浜、2008

③ 吉川正信、高安直子、野田節子、佐藤雄一、小林広幸、橋本篤司、セリンラセマーゼmRNAは主に神経細胞に発現する、第50回日本神経化学会大会、横浜、2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 篤司 (HASHIMOTO ATSUSHI)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：80271592

(2) 研究分担者

吉川 正信 (YOSHIKAWA MASANOBU)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：90276791
小林 広幸 (KOBAYASHI HIROYUKI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：60195807

(3) 連携研究者