

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21249009

研究課題名（和文） D-セリン/ラセメース系による形態形成調節機序の包括的検討

研究課題名（英文） Morphogenetic regulation through D-serine / serine racemase

研究代表者

相磯 貞和 (AISO SADAKAZU)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60138013

研究成果の概要（和文）：本研究は、D-セリン調節の中樞神経系における生理的意義、および調節異常がヒト疾患に与える影響を明らかにすることを目的としている。生理的意義として、(1) D-セリン分解が脊髄では運動神経入力繊維に沿って行われていることを明らかにした。病態生理として、(2)神経変性疾患の一つ筋萎縮性側索硬化症においてD-セリンの分解異常がD-セリン上昇を来し運動神経変性を起こすこと、(3)1型糖尿病モデルにおいてインスリン依存的な海馬D-セリン調節異常を来すこと、を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：This study aims at elucidating physiological and pathophysiological significances of D-serine regulation in the central nervous system. In association with its physiological roles, we found D-serine-degrading enzyme, D-amino acid oxidase, distributed to a motoneuronal input and maintain D-serine at a low level in the region. As a pathophysiological approach, we found D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration and loss of its activity increases spinal D-serine level in amyotrophic lateral sclerosis. Independently, we found that streptozotocin-induced type1 diabetes increases hippocampal D-serine through loss of insulin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	13,800,000	4,140,000	17,940,000
2010年度	12,600,000	3,780,000	16,380,000
2011年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
総計	36,900,000	11,070,000	47,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：発生学・形態形成学

1. 研究開始当初の背景

生体のL-アミノ酸選択性から、哺乳類を含めた脊椎動物にはD-アミノ酸が存在しないと考えられてきた。1990年代になって齧歯類の脳内にL体の1/3もの大量のD体セリンが発見され、その後グルタミン酸受容体の局在

との類似性から神経伝達物質として注目されるようになった。D-セリンは、L-セリンから合成酵素セリンラセマーゼによって合成され、D-アミノ酸オキシダーゼによって分解されると考えられているが、中枢神経におけるそれぞれの酵素の厳密な分布やD-セリン調節における重要性は明らかではなかった。

我々は、D-セリンのグルタミン酸受容体興奮作用に着目して、筋萎縮性側索硬化症という運動神経疾患において D-セリンが病勢とともに増加することを明らかにした。しかし、D-セリンの増加メカニズムおよび運動神経細胞死との因果関係は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、中枢神経系における D-セリン調節メカニズムの組織間の差異による生理的意義、D-セリン調節異常を来す疾患における病態生理的意義を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

D-アミノ酸オキシダーゼ欠損マウスを国際医療福祉大学金野先生のご好意で譲渡いただいた。C57BL マウスを株式会社クレアから購入してそれぞれ戻し交配した。G93A-SOD1 トランスジェニックマウスは Jackson 研究所から購入した。

研究試薬は全て市販のものを用いた。

D-アミノ酸測定には、2次元 HPLC 装置（資生堂）を用い、分析技術を九州大学浜瀬健司先生からご教示いただいた。

この他の実験手法は一般的な分子生物学的手法に従って行った。

4. 研究成果

(1) D-セリン量の分布と合成酵素、分解酵素の分布の比較

2次元 HPLC 装置を用いて、マウス中枢神経組織における D-セリン量を部位別に分析した。D-セリンは、大脳、海馬等の前脳領域では、L-セリンの 1/3 程度存在し、数百 μM の量を認めしたが、一方、小脳および脊髄領域では数 μM 程度のみしか認めなかった。この組織分布の違いの要因を明らかにするため、D-セリン合成酵素であるセリンラセマーゼ (SRR) の免疫組織化学を行ったところ、D-セリン同様前脳優位な分布を示したが、後脳領域においても一部セリンラセマーゼの発現を認めた。そこで、D-セリン分解酵素である D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) 活性を組織上で鋭敏に可視化する系を立ち上げた (図 1)。DAO は、SRR とは対照的に、前脳領域には全く活性を認めず、小脳、脳幹、脊髄に強い活性を認めた。さらに、DAO による貢献を明らかにするため、DAO 欠損マウス中の D-セ

リン量を測定したところ、大脳領域では野生型と差を認めないものの、小脳、脊髄では顕著な上昇を認めたことから、後脳領域では SRR の発現が低いことに併せて DAO の発現が D-セリン制御に必須であることが明らかとなった。

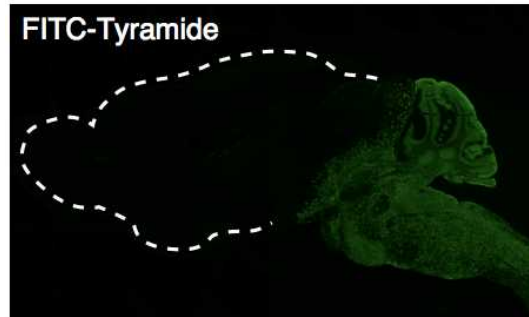


図 1

写真は、DAO 活性を蛍光にて検出する手法を用いて、マウス脳矢状断の DAO 組織分布を表したものである。前脳には DAO 活性を認めないことがわかる。

(2) DAO は網様体脊髄路に分布

さらに、脳幹から脊髄にかけての DAO 活性の組織学的局在を明らかにしたところ、DAO 活性は脊髄では前索のアストログリアに強く認められた (図 2)。マウスでは、上位運動神経は主にこの部位を通過する網様体脊髄路に繊維を送り、下位運動神経に入力することから、D-セリンは生理的には運動神経入力で低く保たれていることが示唆された。



図 2

脊髄の DAO 活性染色結果。写真の上は脊髄腹側を表す。

(3) 筋萎縮性側索硬化症における D-セリン制御異常

筋萎縮性側索硬化症モデルマウスとして G93A-SOD1 トランスジェニックを用いた。2次元 HPLC 装置を用いて D-セリン分析を行ったところ、脊髄では病勢とともに 2-3 倍程度の D-セリンの増加を確認できた。さらに、D-セリン増加の要因を明らかにするため、SRR および DAO の組織学的分布を明らかにしたところ、SRR のマイクログリアでの増加、DAO のアストログリアでの減少を認めた。さらに、いずれの要因が主要であるかを検討するため、DAO 活性欠損 G93A-SOD1 マウスを作成し、脊髄中 D-セリンを測定したところ、通常の DAO 活性欠損マウスと比較して 20%程度のみ

しかし上昇していなかったことから、G93A-SOD1 マウスでの D-セリン上昇は DAO 活性低下が SRR 発現上昇を大きく上回ることが示唆された。また、G93A-SOD1 マウスにおいて、DAO はリン酸化 ERK1/2 陽性の反応性アストロサイトで顕著に活性が低下していたことから、病態生理と DAO が深く関与していることが想起された。

さらに、DAO 活性欠損マウスの脊髄での運動神経の表現型を観察したところ、このマウスでは 20%程度の運動神経細胞数および運動神経細胞の大きさの減少を認め、DAO 活性と運動神経変性との関連性を明らかにした。

(4)1 型糖尿病と D-セリン調節異常

D-セリンは海馬領域に多く存在することから、記憶との深い関連があると考えられている。我々は、糖尿病がアルツハイマー型認知症のリスクであることから、糖尿病による代謝異常が引き起こす神経傷害と D-セリンとの関連性を検討した。

糖尿病は streptozotocin (STZ) を C57BL マウスに投与することによって誘発し、投与後急性期から慢性期にわたって海馬中の D-セリン量を測定した。D-セリンは STZ 投与後 1 週間において 20-30%程度有意に上昇するものの、投与後 1 ヶ月以降においてはコントロールマウスと比較して有意な D-セリン変化が認められなくなった。また、前脳領域で発現が高い SRR の免疫組織化学を行ったが、STZ 投与糖尿病マウスの海馬では SRR の変化は明らかに認めなかった。海馬における D-セリン上昇が糖尿病の病態による変化であることを検証するため、*in vitro* で STZ が神経およびグリアに対して D-セリン合成上昇作用が無いかどうか、血清中グルコース濃度の変化で D-セリン合成に変化が生じるか、を検討した。STZ はそれ単独では D-セリン合成を促すことは無く、血清グルコースの変化によっても D-セリン合成には影響が認められなかった。

STZ 投与マウスに皮下インスリンインプラントを挿入すると、海馬中 D-セリン値は正常化したことから、糖尿病モデルマウスにおける海馬 D-セリンの上昇はインスリンシグナル由来であることが示唆された。

このように STZ 誘発 1 型糖尿病モデルマウスでは、発症急性期にインスリンシグナル依存的に海馬 D-セリンが増加することを明らかにした。しかしながら、この変化は急性期のみ認められる現象で、慢性期には D-セリン変化は認められなくなるため、認知症発症や記憶形成との関連性は乏しいと考えられた。

[雑誌論文] (計 6 件)

Jumpei Sasabe, Yurika Miyoshi, Masataka Suzuki, Masashi Mita, Ryuichi Konno, Masaaki Matsuoka, Kenji Hamase, **Sadakazu Aiso**. D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA*; 109: 627-32. 2012 査読あり

Kanehiro Hayashi, **Jumpei Sasabe**, Tomohiro Chiba, **Sadakazu Aiso**, Naoko Utsunomiya-Tate. D-Serine-containing humanin shows promotion of fibril formation. *Amino Acids*; in press. 2012 査読あり

Jumpei Sasabe, **Sadakazu Aiso**. D-Serine in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Seikagaku*; 82: 628-32. 2010. 査読なし

Jumpei Sasabe, **Sadakazu Aiso**. Aberrant control of motoneuronal excitability in amyotrophic lateral sclerosis: excitatory glutamate/D-serine vs. inhibitory glycine/gamma-aminobutyric acid (GABA). *Chem Biodivers*; 7: 1479-90. 2010 査読あり

Kamata T, Handa M, Ito S, Sato Y, Ohtani T, Kawai Y, Ikeda Y, **Aiso S**. Structural requirements for activation in alphaIIb beta3 integrin. *J Biol Chem*; 285:38428-37. 2010 査読あり

Nakahara J, Kanekura K, Nawa M, **Aiso S**, Suzuki N. Abnormal expression of TIP30 and arrested nucleocytoplasmic transport within oligodendrocyte precursor cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest*; 119:169-81. 2009 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

2011 年 9 月 10 日 発表者: 笹部潤平
CBIR international symposium
'D-Serine homeostasis in the spinal cord and motoneuron degeneration' 場所: 東京

2011 年 9 月 10 日 発表者: 笹部潤平
第 7 回 D-アミノ酸研究会学術講演会
'運動神経路における D-セリンと運動神経変性' 場所: 東京

2010 年 11 月 14 - 15 日 発表者: 笹部潤平
2010 Society for Neuroscience.

‘Control of D-serine by astrocytic D-amino acid oxidase in descending motor tract.’ 場所：サンディエゴ（米国）

2010年9月17日 発表者：笹部潤平
第6回D-アミノ酸研究会学術講演会
‘Control of D-serine by astrocytic D-amino acid oxidase in descending motor tract.’ 場所：富山

〔図書〕（計1件）

笹部潤平、相磯貞和. D-セリンと中枢神経機能. *Annual Review 神経* 2012.2012; 246-252. 中外医学社

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.anatomy.med.keio.ac.jp/aiso/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相磯 貞和 (AISO SADAKAZU)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：60138013

(2) 連携研究者

笹部 潤平 (SASABE JUMPEI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10398612