

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19497

研究課題名（和文）虚血再灌流傷害改善のために必要な環境：L-セリンの役割

研究課題名（英文）Necessary environment for amelioration after ischemic reperfusion injury in brain: the role of L-serine

研究代表者

鈴木 将貴（Suzuki, Masataka）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：90595000

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はアストログリアから産生されるL-セリンが脳虚血再灌流障害後に認められる神経の新生にどのように影響するかを明らかにすることを目的としていた。アストログリア特異的PHGDH欠損マウスに中大脳動脈梗塞（MCAO）を施したのちの梗塞領域の大きさにはflox/floxマウスと有意な差が認められなかった。初代培養神経細胞を用いたIn vitroの検討では、L-セリンがp70S6Kのリン酸化を促進することが確認された。p70S6Kはたんぱく質の合成を促進することで細胞増殖を刺激する因子であることから、L-セリンは神経新生を刺激する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, I aimed to clarify how L-serine, which is supplied by astroglia, affects on neurogenesis after ischemic reperfusion injury in brain of MCAO mouse model. The size of infarct region after MCAO in Astroglia specific knock out of phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) was not significantly different from that in flox/flox mice. L-serine activated phosphorylation of p70S6K in primary cortical neurons in vitro. Because p70S6K is the protein that facilitates protein synthesis and cell proliferation, L-serine possibly stimulates neurogenesis.

研究分野：神経科学

キーワード：虚血再灌流障害 L-セリン

### 1. 研究開始当初の背景

これまで神経は、個体が成体となった後に新生することはないと考えられてきた。しかし近年のマウスを用いた研究で、成体後も海馬歯状回や脳室下帯より神経が新生し、海馬や嗅球などさまざまな領域に移動していくことが明らかにされている(文献 )。

神経新生は様々な刺激により増加することが知られ、特に酸化ストレスへの曝露や癩癩、外傷や虚血などが刺激となることが報告されている。マウス局所性虚血再灌流障害モデルを用いた検討では、障害後早くも2日で脳室下帯と歯状回の神経新生が増加し、1-2週間でピークに達し、3-4週程度で元のレベルに落ち着く。脳室下帯で生まれた新生神経は虚血後に線条体の傷害周囲に移動することが知られている(文献 )。従って傷害組織から何らかのシグナルを経て神経新生が刺激されていると考えられる。

神経新生を刺激する因子として、現在までに epidermal growth factor (EGF) や fibroblast growth factor-2 (FGF-2) の関与が示されている。特に FGF-2 は虚血障害後に発現が増加することから、主要な因子と考えられている。また、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) や glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) などの神経栄養因子も虚血障害後に発現が増加することから、神経新生の重要な刺激分子であると考えられている。

神経の新生にはアストログリアやオリゴデンドログリアなどのグリア細胞を含めた組織環境が重要と考えられる。アストログリアはニューロンへアミノ酸やピルビン酸などの栄養源の供給や神経伝達物質の調整など様々な役割を担っている。

アミノ酸の L-セリンは脳内においてアストロサイトにより産生され、神経へと供給されて解糖系の基質として消費されるか、またはグリシンや D-セリンなどの神経伝達物質の合成基質として利用される。一方で L-セリンは神経栄養因子としての性質をもち、L-セリン合成酵素である phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) の全身欠損マウスは小頭症を呈し胎生期に死に至る(文献 )。さらにアストログリア特異的 PHGDH 欠損マウスにおいても野生型マウスより脳のサイズが小さいことから、アストロサイトが供給する L-セリンが神経の発達に重要であると考えられる(文献 )。

我々は以前、脳梗塞周辺部で D-セリンが増加し梗塞叢の拡大に寄与することを発見した。その際、L-セリンも有意に増加することを発見した(文献 )。L-セリンは神経栄養的に作用することから、梗塞周囲における L-セリンの増加は神経新生を促進させる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究ではアストログリアから産生される L-セリンが脳梗塞後の神経新生へどのように影響するのか、また、その分子メカニズムを明らかにする。

PHGDH のアストロサイト特異的コンディショナルノックアウトマウス(cKO)に中大脳動脈梗塞(MCAO)による脳梗塞モデルを作成し、以下の検討を行う。

### 3. 研究の方法

(1)PHGDH cKO マウス中大脳動脈にナイロン糸を挿入し 30 分間虚血する。再灌流 20 時間後にマウスを安楽死させ脳を採取し、組織中に含まれる D/L-セリン量を測定する。

(2)PHGDH cKO マウスの MCAO モデルにおける梗塞領域を TTC 染色により検討する。

(3)D-セリンの梗塞拡大メカニズムと L-セリンの神経生存への影響を in vitro にて検討する。

### 4. 研究成果

(1) PHGDH cKO マウスの MCAO モデルを作成し、梗塞周囲における D-および L-セリンの量を、二次元 HPLC を用いて測定した。その結果、過去の報告と異なり反対側(図中: contra)と比較して梗塞側(図中: ipsi)の L-セリン(図 1 A)および D-セリン(図 1 B)の有意な増加は観察されなかった。これは、PHGDH モデルでは野生型のマウスより梗塞叢の拡大が予想されたため、過去の報告(文献 )より梗塞時間を短縮して行ったことが原因の一つと考えられた。

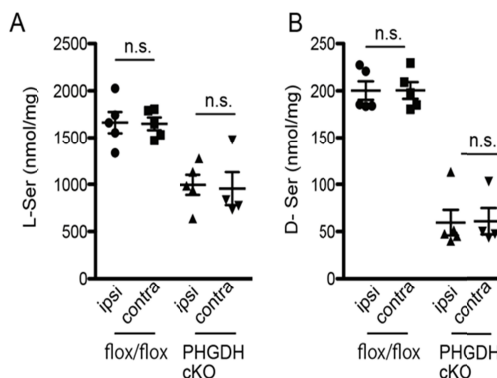


図1 MCAO 処置後 20 時間の囊中 L- および D- セリン

(2)PHGDH cKO マウスの MCAO モデルの梗塞領域を TTC 染色により検討した。flox/flox マウスと比較して PHGDH cKO マウスの梗塞領域に有意な差は認められなかった(図 2)。この結果は(1)の結果で L-セリンの増加が認められなかったことと同様に梗塞時間が短かったことが影響している可能性があり、追加検討が必要と考えられる。

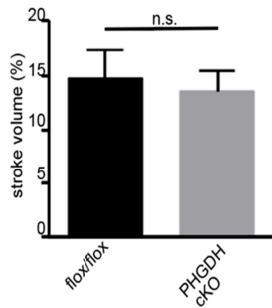


図2 PHGDH cKO マウスの MCAO モデルにおける梗塞領域

(3) 脳梗塞周囲では D-セリンが増加し、梗塞叢の拡大に寄与している。そこで初代培養神経細胞に L-セリン非存在化で D-セリンを処理し WST-8 アッセイにより生存細胞数を検討したところ、生存細胞が大きく減少することを発見した。これに対し D-セリンと同時に L-セリンを処理すると生存率の低下は見られなくなることを見出した(図3)。

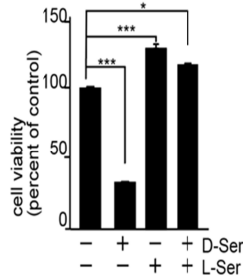


図3 L-セリンはD-セリン誘導性細胞死を抑制する

(3) D-セリンによる細胞増殖の抑制にアポトーシスが関係している可能性を検証するため、caspase-3 の切断をウェスタンブロットで確認した。初代培養神経細胞に L-セリン非存在化で D-セリンを 48 時間処理した結果、caspase-3 の切断が誘導されることを発見した。この作用は L-セリンを添加することにより抑制されることも明らかになった(図4)。

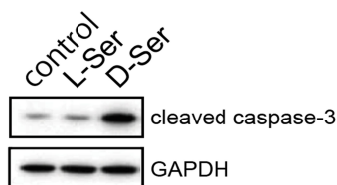


図4 D-セリンによる caspase-3 の切断

(4) L-セリンはタンパク構成アミノ酸である。アミノ酸は mTOR 経路を介して p70S6K をリン酸化しタンパク合成と増殖を誘導する。L-セリンの細胞死抑制作用に mTOR-p70S6K シグナルが関与する可能性を検証するため、Neuro2a 細胞を用いて L-セリン処理後の p70S6K のリン酸化レベルをウェスタンブ

ロットにより検証した。その結果、p70S6K タンパクの Thr389 が L-セリンによってリン酸化を受けることが確認された。このことから L-セリンによる細胞死抑制作用には mTOR-p70S6K シグナルが関与している可能性が示された。

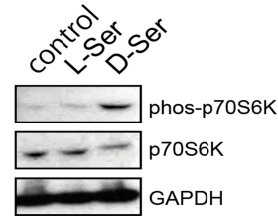


図5 L-セリンによる p70S6K のリン酸化

### 結語

虚血再灌流後に増加する L-セリンは神経栄養因子として神経新生を増加させる可能性がある。しかし本研究期間中では神経新生増加作用の検討を行うことができず、今後のさらなる検討が不可欠である。

L-セリンは D-セリンが誘導する神経生存抑制作用を阻害することが明らかとなった。D-セリンは NMDA 型グルタミン酸受容体(NMDAR) のコアゴニストであり、NMDAR の活性化は神経新生を抑制することが知られている。L-セリンは D-セリンのそれらの作用を阻害することで神経新生を増加する可能性があると考えられる。これらのシグナル伝達系についても更なる検証が必要である。

### <引用文献>

Anacker C, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci.* 2017 Jun;18(6):335-346.

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.* 2002 Sep;8(9):963-70.

Yoshida K, Furuya S, Osuka S, Mitoma J, Shinoda Y, Watanabe M, Azuma N, Tanaka H, Hashikawa T, Itohara S, Hirabayashi Y. Targeted disruption of the mouse 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene causes severe neurodevelopmental defects and results in embryonic lethality. *J Biol Chem.* 2004 Jan 30;279(5):3573-7.

Yang JH, Wada A, Yoshida K, Miyoshi Y, Sayano T, Esaki K, Kinoshita MO, Tomonaga S, Azuma N, Watanabe M, Hamase K, Zaitus K, Machida T, Messing A, Itohara S, Hirabayashi Y, Furuya S. Brain-specific Phgdh deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult

brain. J Biol Chem. 2010 Dec 31;285(53):41380-90.

Abe T, Suzuki M, Sasabe J, Takahashi S, Unekawa M, Mashima K, Iizumi T, Hamase K, Konno R, Aiso S, Suzuki N. Cellular origin and regulation of D- and L-serine in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2014 Dec;34(12):1928-35.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Masataka Suzuki, Nobuaki Imanishi, Masashi Mita, Kenji Hamase, Sadakazu Aiso, Jumpei Sasabe, Heterogeneity of D-serine distribution in the human central nervous system, ASN Neuro, 査読あり, 2017, in press.

〔学会発表〕(計 1 件)

Masataka Suzuki, Jumpei Sasabe, Sadakazu Aiso. Excessive D-serine mediates cell death in developing neuron. Society for Neuroscience 2016, San Diego, U.S.A. November 12-16

〔図書〕(計 0 件)

〔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

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 将貴 (SUZUKI, Masataka)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号 : 90595000