

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790623
 研究課題名（和文） グルタミン酸毒性増悪因子 D-セリンを標的とした筋萎縮性側索硬化症の新規治療法開発
 研究課題名（英文） Therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis targeting D-serine, an exacerbating factor of glutamate excitotoxicity
 研究代表者
 笹部 潤平 (SASABE JUMPEI)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：10398612

研究成果の概要（和文）: 本研究では、運動神経疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症の新規治療法開発に向けた研究を行った。病態とともに増加する D-セリンを抑えるため、増加に最も寄与の高い調節因子を検索したところ、小脳や脊髄に特異的に発現する D-アミノ酸オキシダーゼの発現および活性の低下が本疾患で著しいことが明らかとなった。この酵素の活性を上昇させるような治療が有効である可能性を、本研究によって明らかにした。

研究成果の概要（英文）: In the present study, we investigated amyotrophic lateral sclerosis, one of motor neuron diseases, aiming at developing a novel therapeutic strategy. To suppress the increase of D-serine with disease progression, we searched for the D-serine modulating factor with the highest contribution. We reached a novel finding that the expression and activity of D-serine degrading enzyme, D-amino acid oxidase, was significantly reduced in spinal cord of a model mouse for amyotrophic lateral sclerosis. Increasing the DAO activity may benefit the progression of amyotrophic lateral sclerosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：D-セリン、筋萎縮性側索硬化症

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子の一つである SOD1 変異の発見により、近年盛んに研究が行われてきたが、病態は未だ明らかとなっていない。いくつかの有力な病態仮説の中で、グルタミン酸の興奮毒性は運動神経細胞死においてその重要性が示唆されてきた (Bruijin *et al.*, 2004; Van Damme *et al.*, 2005)。運動神経細胞はグルタミン酸に対して脆弱であることが知られており、ALS 患者ではその脳脊髄液中に健常人と比較して3倍ものグルタミン酸が検出されている (Rothstein *et al.*, 1990)。このグルタミン酸濃度の上昇の原因として、アストログリア細胞においてグルタミン酸輸送体 EAAT2 の機能が低下することによってシナプス間のグルタミン酸の回収が悪化することが知られている (Lin *et al.*, 1998; Trotti *et al.*, 1999; Howland *et al.*, 2002) が、ALS でのグルタミン酸毒性の詳細な機構は明らかとなっていない。

グルタミン酸毒性には神経細胞内への過剰 Ca²⁺ 流入が関与していることが示唆されており、これには主にイオンチャネル型受容体の一つである NMDA 型受容体が主たる役割を果たしている (Prehn *et al.*, 1995)。近年、NMDA 型受容体拮抗薬のメマンチンが ALS モデルマウスの寿命を延長することが報告され (Wang and Zhang, 2005)、NMDA 受容体の ALS 病態への関与が示唆されてきている。しかし、NMDA 受容体の活性化にはグルタミン酸の受容体への結合のみでは不十分であり、共作動薬がグリシン結合部位に結合することが必須であることが知られていることから、ALS におけるグルタミン酸濃度上昇のみでは病態を説明出来ない。

2. 研究の目的

D-セリン量を *in vivo* で増減させることが ALS の進行に関与するか否かを調べ、D-セリンが進行に関与していた場合は D-セリンを標的とした治療法を *in vivo* で確立することが本研究の目的である。本研究期間中に、ALS モデルマウスから D-セリン分解酵素をノックアウトして表現型を解析し、ALS の病勢と D-セリン量との相関を明らかにし、さらに NMDA 受容体グリシン結合部位阻害薬および D-セリン合成阻害薬それぞれを ALS モデルマウスに投与することで、ALS に対する治療標的として D-セリン機能阻害が有効か否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) NMDA 受容体 D-セリン結合部位競合阻害薬の有効性の検討

我々は、ALS モデルマウスの初代培養脊髄前角細胞を用いて、NMDA 受容体 D-セリン結合部位 (グリシン部位) の競合阻害薬である 5,7-dichlorokynurenic acid (DCKA) が D-セリンの神経毒性に対して抑制効果を有する結果を報告した (Sasabe *et al.*, 2007)。このことから考えて、ALS モデルマウスにおいて D-セリンの上昇が開始する時期である 9 週齢から DCKA を投与することによって病態改善が期待される。DCKA の末梢投与による中枢への移行は明らかでないため、我々のグループで確立した頭蓋内カニューラ装置 (Yamada *et al.*, 2005) を 6 週齢の ALS モデルマウス頭部に手術し、カニューラを介して DCKA の髄腔内注射を隔日投与する。通常、ALS マウスは 16 週齢頃で症状を発症するため、DCKA 投与と同時に 9 週齢から行動試験 (Rotarod 試験) を開始し、運動機能の経過を評価する。

(2) D-セリン合成酵素セリンラセマーゼの酵素活性阻害薬の有効性の検討

L-serine-o-sulphate (LSS) はセリンラセマーゼ酵素活性を強力に阻害し、D-セリンの産生を抑えるアミノ酸誘導体である (Dunlop *et al.*, 2005)。LSS はマウスへの投与の安全性が確認されている。ALS モデルマウスでは、9 週齢頃 (発症前) から徐々に D-セリンの蓄積が増加していき、D-セリン合成酵素のセリンラセマーゼも同時期から発現が上昇していることをすでに確認しているため (Sasabe *et al.*, 2007)、9 週目から LSS の腹腔内投与を開始することにより、D-セリンの産生を抑制することが期待できる。

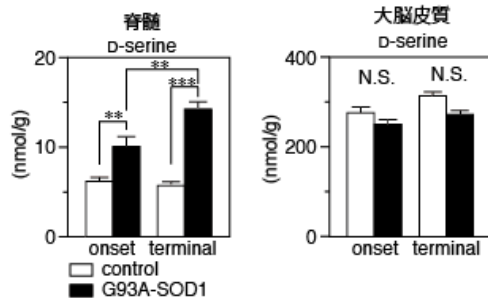
まず、投与間隔および投与による D-セリン産生抑制効果を検討するため、LSS を投与し続けたマウスを 16 週齢 (ALS 発症時期; 著しく D-セリンが蓄積される) で安楽死させ、脊髄中の D-セリン値を生化学的および抗 D-セリン抗体を用いて組織学的に検討する。このことによって、D-セリン産生抑制効果の得られた適切な投与間隔および投与量を基にして、ALS モデルマウスに対して 9 週齢から LSS の投与を開始し、その運動機能に対する効果を行動学的 (9 週齢から Rotarod 試験を開始) に評価し、さらに 16 週齢および死亡時における脊髄を組織学的に検討し、病態改善効果を評価する。

4. 研究成果

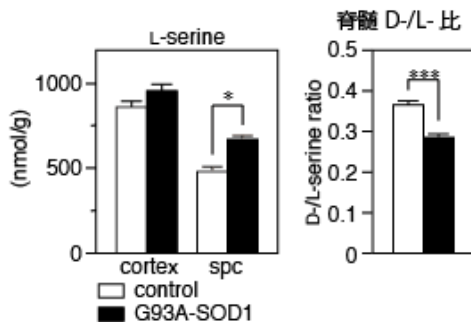
グルタミン酸受容体の一つである NMDA 受容体の共作用薬：D-セリンが、ALS の病態および病勢にどのように影響しているかを検討することが目的である。

(1) D-/L-セリンの定量分析

これまで我々は、免疫学的手法および酵素反応による手法を用いて D-セリンを検出してきた。本研究では、定量的評価のため、2次元 HPLC を用いて、D-セリン量を測定した。D-セリン量は脊髄内で ALS の発症時に 1.6 倍、末期では 3 倍まで増加していることが明らかとなった。さらに、大脳内ではこのような変化が認められないことから、これらの変化は脊髄内特異的变化であることが示唆された。



また、D-セリン量の増加が L-セリン量増加によるものか否かを明らかにするため、L-セリン量についても定量的測定を行ったところ、ALS 末期脊髄においては L-セリン量が有意に増加していた。しかしながら、D-/L-比はさらに増加していることから、D-セリン増加は単に L-セリンの増加によるものではないこ



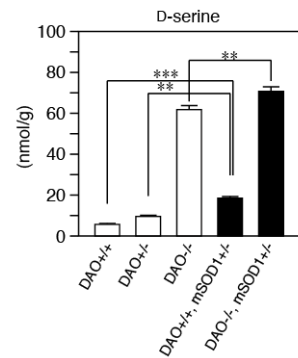
とが示唆された。

(2) DAO ノックアウト ALS モデルマウスにおける D-セリン量の分析

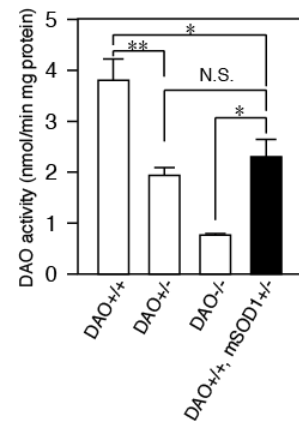
D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) という生体内で唯一の D-セリン分解酵素のノックアウトマウスを用いて、ALS モデルマウスと交配し、D-セリン量の増減を測定した。D-セリンは、ALS では DAO ヘテロノックアウトのレベルにまで上昇していた。また DAO ノックアウ

ト ALS モデルでの D-セリン量は DAO ノックアウトマウスの D-セリン量よりもやや多いものの、ALS モデルマウス内で認められた数倍もの変化はコントロールと比較して認めなかった。

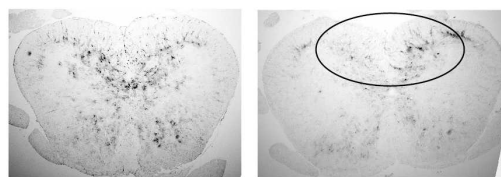
このことから、D-セリンは DAO の活性低下によって、ALS 内で増加していたことが示唆された。



(3) ALS における DAO の活性変化
ここまでの結果から、ALS モデルマウスにおける DAO 活性低下が示唆されたため、実際の DAO 酵素活性を測定した。予想通り、DAO 活性は ALS 脊髄内でおおよそ 50% 程度にまで低下していた。



(4) DAO 活性の低下は脊髄前索において低下
ALS モデルにおける DAO 活性の低下の分布を明らかにするため、D-プロリンを基質として組織上で DAO 活性染色を行った。この結果、脊髄白質、特に前索において DAO 活性が低下していることが明らかとなった。このことから、運動神経の上位ニューロンにおける DAO の活性低下が示唆された。



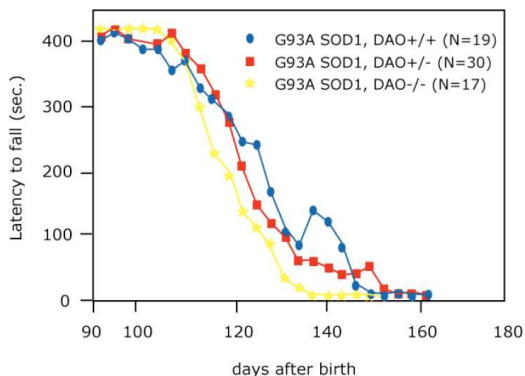
野生型

ALS モデルマウス

(5) DAO による ALS 病勢コントロール

ALS の病勢が DAO ノックアウトにより、どのように変化するかを検討した。その結果、ALS の病勢は DAO をノックアウトすることによって増悪する傾向にあったものの、寿命に対しては有意な影響を認めなかった。

DAO ノックアウトマウスでは、小脳から脊髄にかけての D-セリン濃度が上昇し、セリン以外の D-アミノ酸の中枢神経系濃度も変化さ



せる。特にアラニン、ロイシン、プロリンの D 体アミノ酸の上昇を認める。D-アラニンは、強度は弱いもののグルタミン酸受容体に結合することが知られている。従って、今回 DAO ノックアウトによって得られた ALS の病勢増悪傾向は、純粋に D-セリンの増加に関連していると結論付けることはできないものの、D-アミノ酸の中枢神経系の増加によって、ALS の病勢が進行するという新規の知見が本研究によって得られた。

これらの結果から DAO の活性低下が ALS の病態において病勢増悪と関連していることが明らかとなった。家族性 ALS の原因遺伝子としても DAO が近年発見されたことも考慮すると、本研究で明らかとなった新規の知見により、DAO の活性調節が、ALS の治療標的として非常に重要であることが強く示唆された。

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 2 件)

J. Sasabe and S. Aiso. Aberrant control of motoneuronal excitation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: excitatory glutamate/D-serine vs. inhibitory glycine/GABA. Chemistry and biodiversity. 2010. in press.

笹部潤平、相磯貞和
筋萎縮性側索硬化症における D-セリン
日本生化学会誌. 2010. in press.

〔学会発表〕(計 2 件)

J. Sasabe et al. Quantitative analyses of D-/L-serine in mice model for amyotrophic lateral sclerosis. 北米神経科学会. 2009 年 10 月 20 日. シカゴ、USA

〔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
特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹部 潤平 (SASABE JUMPEI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 10398612

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし