

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16655

研究課題名（和文）D-セリン-AMPA受容体相互作用の分子機構解明と統合失調症治療法開発への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of D-serine - AMPA receptor interaction and its application to the development of a treatment for schizophrenia

研究代表者

海野 真一（UMINO, Masakazu）

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：00735855

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：D-セリン-AMPA受容体相互作用の分子細胞機構を解析するため、免疫組織化学法により、未解明のD-セリンの細胞局在を調べ、大脳皮質灰白質および海馬歯状回では神経細胞体マーカーNeuNやオリゴデンドログリアマーカーCNPaseと、大脳皮質白質ではCNPaseと、共存することを明らかにした。この所見はD-セリンが前脳部において神経細胞体、傍神経および束間オリゴデンドログリアに含有され、AMPA受容体による制御を受ける可能性を示唆している。一方、統合失調症死後脳前頭葉皮質におけるAMPA受容体サブユニット遺伝子のGRIA1-GRIA4のmRNA発現には対照群と有意な差異は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究者は、統合失調症における既存の治療薬に反応性・抵抗性双方の症状の病態に係るNMDA受容体機能不全の改善方法を検討し、同受容体の活性化に不可欠なD-セリンのシグナルを、AMPA受容体遮断薬により増強することが有用な可能性を動物実験で示した。神経細胞体や束間および傍神経オリゴデンドログリアがD-セリンを含むことが、本研究によって初めて明らかにされたことにより、これらの細胞に発現するAMPA受容体がD-セリンを調節することが示唆され、両者の相互作用の分子機構解明に重要な手がかりを与えたと考えている。この解明により、統合失調症を始めとする脳疾患の新規治療法開発の進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanism underlying the D-serine-AMPA receptor interaction, we have investigated the uncovered localization of D-serine by using immunocytochemical methods, and found that D-serine positive cells show immunoreactivity (1) to the neuronal cell body marker NeuN and the oligodendroglia marker CNPase in the cortical gray matter and hippocampus and (2) to CNPase in the cortical white matter. These results suggest that D-serine may be localized to neuronal cell bodies and perineuronal oligodendroglia in the gray matter and to intrafascicular oligodendroglia in the white matter of cortical and hippocampal tissues. The AMPA receptor expressed on these cells could regulate D-serine signaling. There is no change in the mRNA levels of AMPA receptor subunit genes (GRIA1-GRIA4) in the postmortem prefrontal cortex of patients with schizophrenia.

研究分野：精神医学

キーワード：統合失調症 D-セリン AMPA受容体 NMDA受容体

1. 研究開始当初の背景

D-セリンは、哺乳類組織のアミノ酸はL型で占められD型は存在しないとの定説に反して、本研究者が所属する研究グループにより、脳優位に分布し一生の間高濃度に保たれることが見出されたD型アミノ酸である。ヒトの精神機能をはじめとする高次脳機能の発現・制御に中心的な役割を果たす、NMDA型グルタミン酸(Glu)受容体(NMDA受容体)に対して、(i)単独では活性化しないが、(ii)アゴニストのGluによる活性化には必須であり、(iii)Gluの作用を増強する作用がある点から、NMDA受容体の内在性コアゴニストとして不可欠な物質であることが明らかになった。実際に、D-セリン合成酵素・セリンラセマーゼの遺伝子が欠損するマウスでは、同受容体の機能的低下や、関連する神経活動、行動、シナプス形態等の異常が生ずる。さらに、統合失調症、気分障害、脳血管障害時の神経細胞障害、小脳失調症等の、NMDA受容体の機能障害が示唆される、精神神経疾患においてもD-セリンのシグナル異常が関係する可能性が注目を集めている。したがって、NMDA受容体に直接作用する細胞外液中のD-セリンには、同受容体の生理的機能を維持できる一定濃度に精密に調節する分子細胞メカニズムが必要であり、その解明は脳機能の基盤を理解し、脳疾患の治療を進歩させる上で重要な課題と考えられる。

本研究者は、統合失調症の難治性の症状を含む病態にNMDA受容体機能不全が関与している点に注目し、同受容体の機能を回復させることが、患者の社会復帰を拒む要因である陰性症状・認知症状等の、既存の治療薬が奏功しない症状にも効果を及ぼす新しい治療法の開発に繋がると考え、検討を進めてきた。NMDA受容体の機能低下は代償的にグルタミン酸放出を増大させることが知られており、種々のグルタミン酸受容体を過剰に刺激される。このうちAMPA受容体の作動薬が細胞外D-セリン濃度を低下させることを報告していたことから(Int J Neuropsychopharmacol, 2013)この低下がNMDA受容体機能を低下させる悪循環を生むと推測し、AMPA受容体の作動薬遮断薬が、D-セリン濃度を上昇させNMDA受容体機能の回復に繋がると考えた。また、NMDA受容体機能の賦活は、従来の臨床研究の結果に基づくと、もう一つの同受容体の内在性コアゴニストであるグリシンよりD-セリンを調節する方が効率的と推察された。そこで、NMDA受容体遮断薬が引き起こすマウスの異常行動が、AMPA受容体遮断薬によって抑制されることを明らかにし(J Neural Transm, 2018)AMPA受容体D-セリン相互作用が統合失調症の新規治療法開発の標的として重要な可能性を示した。しかし、現状ではD-セリン含有細胞さえも十分同定されているとはいえず、この相互作用が生ずる分子細胞機構を解明することが急がれていた。

2. 研究の目的

本研究では、AMPA受容体がD-セリンを制御している細胞と、その相互作用の基盤となる分子機構を解明し、統合失調症で障害されると考えられるNMDA受容体の機能回復による、本症の革新的な治療法の手がかりを得ることを目指している。

このため、本研究者のグループが独自に作製したD-セリン特異的抗体を活用して、難航しているD-セリン含有細胞とその種類を明らかにする。また、D-セリン含有細胞で発現するAMPA受容体と関連する候補分子の検索を進め、D-セリンのシグナルを細やか(fine tuning)かつ安全に制御する方法の確立に繋げる。一方、AMPA受容体の統合失調症の脳における変化の可能性や、GABA伝達を始めとしてAMPA受容体以外のD-セリン制御系との関係も検討する。これらの研究に基づき、新規治療薬開発の最適な標的となる分子および細胞を見出す。

3. 研究の方法

(1) D-セリンとBSA(牛血清アルブミン)をグルタルアルデヒドで架橋した複合体に対する抗体(D-セリンとグルタルアルデヒドの部分認識)を作製し、免疫組織化学法を用いて、ラットおよびマウスの脳切片で免疫染色を行った。また、神経核に存在するNeuN特異的抗体、傍神経ならびに束間オリゴデンドログリアのCNPas特異的抗体を、抗D-セリン抗体と同時に反応させる二重染色を行い、D-セリン陽性細胞の種類を検討した。

(2)AMPA受容体による細胞内カルシウム調節と関係するIP3受容体type2とD-セリン理化学研究所・御子柴博士が作出したIP3受容体type2を欠損するマウスの譲渡を受け、内側前頭葉皮質において、in vivoダイアリシス(脳内微小透析法)を用いて細胞外D-セリンの濃度を測定した。In vivoダイアリシスでは、実験2日前に目的とする部位に、微小な透析チューブを埋め込み、実験当日にリング液をチューブ内に灌流して、半透膜を介して細胞外の物質を回収し、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーで、D型とL型のアミノ酸を分離・定量的計測を行った。

(3) 統合失調症患者の死後脳におけるAMPA受容体遺伝子の発現

統合失調症患者の死後脳 Brodmann46 野はスタンレイ脳バンクより供与を受け、AMPA 受容体各サブユニット遺伝子 (GRIA1~GRIA4) の mRNA に特異的プローブを設計し、RT-PCR 法により、半定量的に mRNA 量を測定した。

(4)GABA 合成律速酵素 GAD67 のパルプアルブミン陽性細胞選択的欠損と D-セリン
群馬大学・柳川博士より恵与された、GABA 合成律速酵素 glutamate decarboxylase 67 (GAD67) をパルプアルブミン陽性細胞選択的に欠損したマウスの大脳皮質から RNA を抽出し、RT-PCR 法を使って、GAD67 及び D-セリン合成酵素の serine racemase (SRR) の mRNA 発現量を半定量的に調べた。

4. 研究成果

(1)D-セリンの含有細胞の解析

ラット、マウスの前脳部において、D-セリン陽性細胞は、大脳皮質の灰白質・白質、海馬、線条体ほか広く分布していた。大脳皮質灰白質および海馬歯状回の D-セリン陽性細胞では神経細胞体マーカー NeuN やオリゴデンドログリアマーカー CNPase の免疫反応が認められ、細胞断面の解析により、D-セリンの免疫反応は主に細胞表面に検出されることが明らかになった。大脳皮質白質においては D-セリンと CNPase の免疫反応が共存する細胞が観察された。以上の所見から、D-セリンは大脳皮質灰白質および海馬歯状回の神経細胞体と傍神経オリゴデンドログリアに局在し、大脳皮質白質の束間オリゴデンドログリアに含有される可能性が示唆された。この可能性は、本研究者らの別の研究で、キノリン酸を用いて神経細胞体を選択的に破壊した内側前頭葉皮質や、クプリゾンによってオリゴデンドログリアを選択的に破壊した大脳皮質において、D-セリンの組織中濃度が著明に減少した結果からも支持される。

(2)AMPA 受容体による細胞内カルシウム調節と関係する IP3 受容体 type2 と D-セリン

IP3 受容体 type2 を欠損する C57BL6/J 系統マウスと同系統の正常マウスの、内側前頭葉皮質において、*in vivo* ダイアリシスを用いて細胞外 D-セリン濃度を比較したところ、両群間に有意な差異がないことがわかった。したがって、IP3 受容体 type2 は、D-セリンの基礎的な細胞外濃度の調節に主要な役割を果たしていないと推測される。

(3)統合失調症患者の死後脳における AMPA 受容体遺伝子の発現

統合失調症患者死後脳の前頭前野・Brodmann46 野において、AMPA 受容体各サブユニット GRIA1~GRIA4 をコードする遺伝子の mRNA の発現量は、非精神神経疾患の対照群と比較して有意差はなかった。このデータは、統合失調症死後脳前頭葉の AMPA 受容体への放射性リガンド結合に差異がなかったという報告と矛盾しない。

(4)GABA 合成律速酵素 GAD67 のパルプアルブミン陽性細胞選択的欠損と D-セリン

GABA 合成律速酵素 GAD67 のパルプアルブミン陽性細胞選択的欠損マウスの大脳皮質においては、GAD67 遺伝子の mRNA 発現量が減少することが確認され、D-セリン合成酵素のセリンラセマーゼ遺伝子の mRNA 発現量が上昇する結果が得られた。本研究者らの別の研究では、GABA 伝達低下が細胞外 D-セリンを低下させることが明らかになっており、上記のマウスでは長期間 GABA 伝達低下が持続し D-セリンシグナルが減弱していたと推測されることより、代償的に D-セリン合成が亢進した可能性が示唆される。本マウスでは実際に、成熟期には内側前頭葉皮質の細胞外 D-セリンが増加する (未発表データ)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Umino Asami, Iwama Hisayuki, Umino Masakazu, Shimazu Dai, Kiuchi Yuji, Nishikawa Toru	4. 巻 47
2. 論文標題 Effects of Quinolate-Induced Lesion of the Medial Prefrontal Cortex on Prefrontal and Striatal Concentrations of d-Serine in the Rat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2728 ~ 2740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03627-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toru Nishikawa, Asami Umino, Masakazu Umino	4. 巻 November
2. 論文標題 D-Serine: Basic Aspects with a Focus on Psychosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NeuroPsychopharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 1-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-319-56015-1_470-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toru Nishikawa, Asami Umino, Masakazu Umino	4. 巻 November
2. 論文標題 D-Serine in the Treatment of Psychosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NeuroPsychopharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-319-56015-1_391-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Umino M, Umino A, Kiuchi Y, Nishikawa T.
2. 発表標題 D-Serine-AMPA receptor interaction to development of a novel treatment for schizophrenia.
3. 学会等名 The 5th International Congress of D-Amino Acid Research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海野真一、海野麻未、木内祐二、西川 徹.
2. 発表標題 脳内D-セリンに対するクプリゾンおよびキノリン酸の影響.
3. 学会等名 BP/CNP/NP/PP4学会合同年会.
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------