

## 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11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390330

研究課題名（和文） グルタミン酸受容体機能制御による統合失調症の新規治療法開発に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the development of novel pharmacotherapy for schizophrenia that regulates the glutamate receptors

研究代表者

西川 徹（NISHIKAWA TORU）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00198441

研究成果の概要（和文）：

多くの統合失調症患者の社会復帰を阻む、既存の治療薬に抵抗する症状の病態解析と治療法開発のため、NMDA型グルタミン酸受容体遮断薬が、これらの難治症状類似の異常を引き起こすことに注目し、本受容体機能調節の分子細胞機構を検討した。本受容体の生理的な働きに不可欠な脳内D-セリンの、組織中・細胞外中の濃度調節に関する、薬物の影響や、酵素・イオンの役割について新たな所見が得られ、さらなる検討に必要な遺伝子操作マウスの作製が進展した。

研究成果の概要（英文）：

To obtain further insight into the pathophysiology of and the development of a novel pharmacotherapy for schizophrenia with a special attention on the schizophrenia-like symptoms induced by NMDA type glutamate receptor antagonists that are resistant to the currently used antipsychotics, we have studied and added new findings on the molecular and cellular mechanisms underlying regulation of tissue and extracellular contents of D-serine that is required for the physiological functions of the NMDA receptor. We also advanced the processes of the genetically modified animals needed to clarify the mechanisms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：統合失調症，グルタミン酸伝達機構，D-セリン，NMDA受容体，抗精神病薬抵抗性症状，グリシン調節部位，亜鉛調節部位，大脳新皮質

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、人生の早期（主に15～35才）におよそ0.8%の高率で発症し、治療薬（抗精

神病薬）に抵抗する症状のために慢性化し易く、多くの患者の社会復帰を阻む重大な精神障害である。本症の入院患者数は国内だけで

約20万人に及び、十分な社会生活の機能をと  
り戻す患者は2割にも満たないとの報告も  
ある。したがって、患者本人と家族はもちろ  
ん社会にとっても、新しい治療法の開発が急  
務になっている。

既存の抗精神病薬の抗ドーパミン作用と、  
ドーパミン (DA) 作動薬が統合失調症様幻  
覚・妄想状態を引き起こすことから、統合失  
調症患者の脳における過剰なDA伝達が推測  
され、「DA仮説」として治療薬の開発に貢  
献してきた。しかし、DA仮説が説明するの  
は主に幻覚・妄想を中心とする陽性症状の病  
態であり、抗精神病薬抵抗性の感情鈍麻、思  
考の貧困、意欲減退などの陰性症状や認知機  
能障害に対する分子機構の理解や治療法の  
開発は進まなかった。こうした限界を克服す  
るためには、既存薬には見られない薬理作用  
にも注目する必要があると考えられる。

1980年代に、統合失調症様の陽性・陰性  
双方の症状を発現することで注目されてい  
たPCPやケタミンが、NMDA受容体を強力  
に遮断することが発見されて以来、NMDA  
受容体を介するグルタミン酸伝達の低下が、  
統合失調症の陽性・陰性双方の症状の病態に  
関与すると考えられるようになった。本研究  
課題は、この「グルタミン酸仮説」を支持す  
る所見を根拠として、研究代表者および欧米  
の複数の研究グループによって1980年代後  
半から始められた、NMDA受容体を賦活す  
る薬物を本症の治療に導入する試みの一環  
として位置づけられる。さらに研究代表者は、  
NMDA受容体グリシン調節部位に作用して  
本受容体機能を促進する物質のうち、グリシ  
ン以外にD-セリンも脳に恒常的に存在す  
ることを発見し、D-セリンの代謝系も統合失  
調症の病態解明や治療法開発において重要  
な位置を占めることを提唱した。

欧米では、既にNMDA受容体グリシン調  
節部位をはじめグルタミン酸伝達系を標的  
とした薬物を用いた臨床研究も行われてい  
るが、さらなる統合失調症の病態解析と、よ  
り優れた治療法開発のためNMDA受容体機  
能制御の分子細胞機構の解明が求められて  
いる。

## 2. 研究の目的

本研究では、フェンサイクリジン (PCP)  
等のNMDA型グルタミン酸受容体遮断薬が  
惹起する統合失調症様状態において、既存の  
抗精神病薬が奏功する陽性症状とともに、難  
治性の陰性症状や認知機能障害と酷似した  
異常が見られる現象に着目し、NMDA受容体  
機能を促進することにより双方の症状を改

善する新たな治療法開発をめざす。

このため、NMDA受容体の生理的活性化と  
促進性修飾に不可欠な役割を果たすグリシ  
ン調節部位に対するシグナル調節機構につ  
いて、基礎的・臨床的研究を行う。すなわち、  
1)グリシン調節部位に選択的作用をもち、か  
つ類似した脳内分布を示す内在性作用物質  
であるD-セリンのシグナル制御の分子細胞  
機構を明らかにし、2)本調節部位の部分作  
動薬でありNMDA受容体機能を増強する既存  
薬物・D-サイクロセリンの臨床応用法の改良  
と有効症例の特徴の検討を行うことにより、  
NMDA受容体機能促進性の新規抗精神病薬  
の標的として適切な分子および細胞と、有効  
症状・適合症例を見出す。

## 3. 研究の方法

本研究に関連する臨床研究および試料の  
採取に関しては、ヘルシンキ宣言および厚  
生労働省のガイドラインにもとづき、イン  
フォームト Consentと被験者の文書によ  
る同意を得て行うこととし、東京医科歯科  
大学倫理委員会で審査・承認後に行った。  
また、動物実験は、生命倫理、必要性、妥  
当性などを東京医科歯科大学実験動物委員  
会において審査の上承認を得た。組換えDNA  
実験については、文部科学省組換えDNA実  
験指針を遵守して遂行することとし、東京  
医科歯科大学組換えDNA実験安全委員会で  
承認された。

### (I) 基礎的研究

#### (1) 対象および薬物

実験には、生後50日齢のWistar系雄性ラ  
ットまたはおよびserine racemaseの遺伝子  
操作を行った8~12週オスのC57BL/6J系マ  
ウスを用いた(国際福祉大学・金野柳一教授  
より供給)。動物は $25.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度55%、  
8時より20時を明期とする明暗条件下で飼  
育した。試薬は、すべて市販のものを用いた。

#### (2) In vivo ダイアリシス

前頭葉の細胞外液中のD-セリンおよび他  
のアミノ酸は、マイクロダイアリシス法によ  
り測定した。すなわち、ペントバルビタール  
(40mg/kg、腹腔内注射(i.p.))麻酔下で、  
ステレオタキシーを使い、直管型透析プロー  
ブ(エイコム社製)、透析膜部位の長さが3mm  
(ラット)または2mm(マウス)のものを  
内側前頭葉皮質に埋め込んだ(ラット, AP  
+3.2mm, L -0.6mm, V +5.2mm (Paxinos &  
Watsonの図譜, 2001); マウス, AP +1.5, L  
-0.35, V +3.5 (Patrickらの図譜, 2000))  
に埋め込んだ。薬物投与実験は、手術2日後  
に行い、プローブ内へのRinger液(NaCl,

147 mM; KCl 4 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mM; pH 7.3) の持続的灌流を開始した (流速 2 μl/min)。脳内の細胞外液中の低分子を含む灌流液は、マイクロフラクションコレクターにより 0.8ml バイアル内へ蓄積して 20 分毎に回収し、-80°C で保存した。

### (3) 脳組織のアミノ酸測定用調整

ラットの嗅脳溝より上部の大脳皮質を大脳新皮質として取り出し、内部標準物質として D-ホモシステイン酸を含む 5% のトリクロロ酢酸(TCA)溶液でホモジナイズし、遠心処理後、上清をアミノ酸測定まで -80°C で保存した。

### (4) 高速液体クロマトグラフィーを用いたアミノ酸の定量

各サンプル中の遊離型アミノ酸は、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC) によって測定した。凍結保存しておいたサンプルは、測定時に融解し、キラルアミノ酸の分離のため、Bos-L-Cys を加えて誘導体化した後、さらに蛍光測定用誘導体化のため OPA を添加した。前処理が終わったサンプル中のアミノ酸を、逆相カラム (Nova-PakC18 (300×3.9mm,i.d, Waters, Japan)) で分離した後、蛍光検出器 (821-FPS spectrofluorometer (Jasco international CO. Ltd, Japan)) により、励起光波長 344nm、検出波長 433nm で定量した。

### (5) dsm-1 ノックアウトマウスの作製

研究代表者らが、D-セリンの細胞外への放出を増加させ、細胞内への蓄積を減少させる遺伝子として、ラット大脳新皮質からクローニングした dsm-1 (D-serine modulator-1 : ヒト 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulphate transporter 1 (PAPST-1) の orthologue) の生理的役割を知るため、本遺伝子を特異的細胞で欠損するマウスの作製を継続した。dsm-1 は全身的に発現しているが、脳内では D-セリンの類似した前脳部優位の発現分布を示す。そこで、Cre-loxP システムを使って、前脳部選択的に dsm-1 を欠損するマウスの作出を試みた。

## (II) 臨床的研究

### (1) D-サイクロセリンによる統合失調症患者の治療試験

外来通院または入院による抗精神病薬の標準的な治療を受けており、書面で同意の得られた統合失調症患者 (DSM-IV および ICD-10 の単純型統合失調症を含む、20 才以上 70 才未満の者) を対象として、休薬期間 1 週間を挟んで試験期間が 13 週間の D-サイクロセリンまたはプラセボのクロスオーバー二重盲検試験を行う。D-サイクロセリンの効

果は、種々の統合失調症症状評価尺度 (PANSS, SANS, GAS 等)、錐体外路症状評価尺度 (AIMS)、認知機能検査 (SIRP, WCST, Stroop Test, Miller-Selfridge Test, tests for verbal frequency, digit span, finger tapping 等) によって評価し、MRI (T1, T2, FLAIR および diffusion tensor imaging)、眼球運動検査や血液中 D-サイクロセリン濃度測定の結果との関係を調べる。

## 4. 研究成果。

### (I) 基礎的研究

#### (1) 内側前頭葉皮質細胞外 D-セリン濃度の調節機序

NMDA 受容体コアゴニストとしてその活性化に必須の D-セリンの、細胞外濃度が背御される分子機構は、統合失調症の病態解析や治療薬開発の標的となっており、解明が待たれている。

本研究では、NMDA 受容体に得意的結合部位をもつ亜鉛イオンが、内側前頭葉皮質の細胞外 D-セリン濃度を低下させることが新たに分かった。一方、脱分極刺激時に生ずる、同部位での細胞外 D-セリン濃度の低下のメカニズムを検討する目的で、上記所見に基づき、亜鉛のキレート剤を灌流したが、有意な効果は認められなかった。

D-セリン生合成酵素候補のセリンラセマーゼをノックアウトしたマウスでは、脳組織中 D-セリン濃度が著明に減少することが報告されているが、内側前頭葉皮質細胞外 D-セリン濃度も同腹対照群に比べて有意に低下し、細胞外 D-セリンも組織における D-セリン合成の影響を受けることが示唆された。これに対して、グリシンおよび L-セリンの濃度は変化しなかった。今後は、現在準備中の戻し交配を行った動物で検討する予定である。

#### (0) 統合失調症様陽性症状発現薬の細胞外 D-セリン濃度に与える影響

これまでの研究で、NMDA 受容体と統合失調症で亢進するドーパミン伝達の相互作用や、陽性症状のモデルである methamphetamine (MAP) がラットに引き起こす移所運動量の増加を NMDA 受容体グリシン調節部位の選択的作動薬が抑制することを明らかにしてきた。そこで、この相互作用のメカニズムをさらに理解するため、MAP 投与時の内側前頭葉皮質における細胞外 D-セリン濃度の変化を調べた。予備的実験では MAP 皮下投与後に軽度の上昇が示唆されたが、内側前頭葉皮質局所内に 10~1000 μM を灌流しても、有意な変化は認めら

れなかった。力価は弱いもののドーパミン伝達に拮抗作用をもつクロザピンも有意な影響を示さなかったことを考え合わせると、これらの所見は、主として陽性症状と関係するドーパミン伝達亢進は、内側前頭葉皮質内において細胞外D-セリンシグナルに強い影響を与えないことが示唆された。

(1) D-サイクロセリンの脳新皮質組織中D-セリン濃度およびD-セリン代謝関連酵素活性への影響

従来から、統合失調症に対する臨床試験を進めているD-サイクロセリンは、D-セリンと化学構造上類似しているため、D-セリン代謝に影響する可能性について、ラットを用いて検討してきた。本研究では、D-サイクロセリン300mg/kgを腹腔内投与したラットにおいて、脳新皮質の組織中D-セリン濃度が、投与後6～12時間にわたって増加することがわかった。これに対して、投与3～6時間後に、L-セリン濃度が上昇しグリシン濃度が低下した。

したがって、D-サイクロセリンは、部分作動薬としてNMDA受容体グリシン調節部位に作用したり、これまでに報告したように細胞外液中D-セリン濃度を増加させるだけでなく、脳組織中D-セリン濃度を上昇させる作用があり、L-セリン・グリシン濃度の変化と関係する可能性が示唆された。組織中D-セリン濃度の上昇が、細胞外液中のD-セリン濃度の増加よりはるかに遅れて生ずる現象や、双方の臨床効果における意義については、今後さらに検討する必要がある。

(5) dsm-1 コンディショナルノックアウトマウスの作製

Creリコンビナーゼの標的となる、loxP配列でdsm-1遺伝子をはさんだターゲティングベクターを組み込んだマウスを作出し、CreリコンビナーゼをCam kinaseIIのプロモーターにより前脳部神経優位に発現するマウスと交配する段階まで進んだ。

## (II) 臨床的研究

D-サイクロセリン(DCS)の臨床試験では、患者への協力要請方法・臨床症状評価・長期入院患者を対象に加える可能性等について、改良または新たな対策を立てた。

無水乳糖で調整したD-サイクロセリンの粉末を明治製菓より購入し、東京医科歯科大学医学部附属病院薬剤部において、D-サイクロセリン25mgを含むカプセルを無菌的に作製した。またプラセボ用として、同じ重量の無水乳糖を含むカプセルを用意した。現在、患者のエントリー、D-サイクロセリンあるい

はプラセボの投与、種々の検査等がプロトコールに従って進行中であり、未だキーオープンはしていない。

## 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31件)

1. Uezato A, Yamamoto N, Kurumaji A, Toriihara A, Umezaki Y, Toyofuku A, Nishikawa T, "Improvement of asymmetrical temporal blood flow in refractory oral somatic delusion after successful electroconvulsive therapy", J of ECT, 査読有、28巻、2012、pp. 50-51
2. Uezato A, Kimura-Sato J, Yamamoto N, Iijima Y, Kunugi H, Nishikawa T, "Further evidence for a male-selective genetic association of synapse-associated protein 97 (SAP97) gene with schizophrenia", Behavioral and Brain Functions, 査読有、8巻、2012、pp. 2
3. Ozaki A, Nishida M, Koyama K, Ishikawa K, Nishikawa T, "Donepezil-induced sleep spindle in a patient with dementia with Lewy bodies", Psychogeriatrics, 査読有、2012、in press
4. Nishida M, Nariyai T, Hiura M, Ishii K, Nishikawa T. "Memory deficits due to brain injury: unique PET findings and dream alterations.", BMJ Case Reports, 査読有、2011、電子出版
5. Kurumaji A, Umino A, Nishikawa T, "Effects of novelty stress on hippocampal gene expression, corticosterone and motor activity in mice.", Neuroscience Research, 査読有、71巻、2011、pp. 161-167.
6. Jitoku D, Hattori E, Iwayawa Y, Yamada K, Toyota T, Kikuchi M, Maekawa M, Nishikawa T, Yoshika T, "Association Study of Nogo-related Genes with Schizophrenia in a Japanese Case-control Sample.", Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 査読有、156巻、2011、pp. 581-592.

他

〔学会発表〕（計71件）

1. Nishikawa T、” Molecular mechanisms of adolescence-dependent onset of schizophrenia. “、The 32nd Naito Conference on Biological basis of mental functions and disorders、2011年10月19日、山梨
2. 西川 徹、『D-セリンと統合失調症. シンポジウム「D-アミノ酸の生化学:飛躍する新領域」』、第84回日本生化学会大会、シンポジウム、2011年9月24日、京都
3. Nishikawa T、” D-Serine and schizophrenia.”、CBIR International Symposium、2011年9月10日、東京
4. Nishikawa T、” D-Serine-mediated Glia-synapse Interaction and Schizophrenia.”、The 29th Naito Conference on GLIA WORLD、2010年10月8日、神奈川。
5. 西川 徹、『統合失調症の分子機構への発達神経薬理学的アプローチ (A developmental neuropharmacological approach to the molecular basis of schizophrenia)』、Neuro2010、2010年9月3日、神戸。

他

〔図書〕（計2件）

1. 西川 徹、光文社、「薬の作用メカニズムから見た統合失調症の病態。脳（ブレイン）バンクー精神疾患の謎を解くためにー 加藤忠史&ブレインバンク委員会（編集）」、2011、pp. 184-193.
2. 西川 徹、中山書店、「精神薬理学 3. D-セリンと統合失調症。神庭重信・加藤忠史（編）。専門医のための精神科臨床リユミエール 16 脳科学エッセンシャルー精神疾患の生物学的理解のために」2010、pp. 209-211.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

西川 徹 (NISHIKAWA TORU)

東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究科・教授

研究者番号：00198441

(2)研究分担者

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70312296

(3)連携研究者

車地 暁生 (KURUMAJI AKEO)

東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究科・准教授

研究者番号：00251504

竹内 崇 (TAKEUCHI TAKASHI)

東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究科・助教

研究者番号：70345289

西多 昌規 (NISHIDA MASAKI)

東京医科歯科大学

東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究科・助教

研究者番号：10424029

熱田 英範 (ATSUTA HIDENORI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60401329