

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 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22700332

研究課題名（和文） てんかん病態における脳内 D-セリンの機能解明

研究課題名（英文） The role of D-serine in epilepsy

研究代表者

井上 蘭 (RAN INOUE)

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・助教

研究者番号：70401817

研究成果の概要（和文）：本研究では、セリンラセマーゼノックアウト（SRKO）マウスを用いて、PTZ誘発痙攣発作における脳内D-セリンの機能を検討した。SR-KOマウスは高濃度のPTZにより誘発されるclonic-tonic痙攣発作に対し抵抗性を示し、痙攣発作の持続時間が野生型（WT）マウスに比べ有意に短かった。この結果に一致して、SR-KOマウスでは高濃度PTZ投与後の大脳皮質、海馬CA1、CA3ならびに扁桃体におけるc-fos（神経活動の興奮レベルの指標）発現細胞がWTマウスに比べ有意に減少した。また、WTマウスではPTZ投与後に細胞外グルタミン酸濃度が上昇するのに対し、SR-KOマウスではPTZ投与後の細胞外グルタミン酸濃度の増加が認められなかった。以上の結果から、D-セリンの合成を抑制することにより全般性tonic-clonic痙攣など重症の痙攣に対する感受性を低下させることが示唆され、今後SRやD-セリンをターゲットとする新規治療薬の開発が重症の痙攣発作の治療に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the effect of D-serine deficiency on the seizures induced by a single injection of pentylenetetrazole (PTZ) using SR knockout (KO) mice. We found that, compared with wild-type (WT) mice, SR-KO mice showed the attenuation of seizure expression in terms of a significantly shortened duration of generalized seizures and resistance to generalized clonic-tonic seizures. Consistently, immunohistochemical analysis of c-Fos demonstrated that the level of c-Fos labeling induced by high-dose PTZ in the cerebral cortex, hippocampal CA1, hippocampal CA3, and the basolateral nucleus of the amygdala in WT mice was significantly higher than that in SR-KO mice. Moreover, PTZ induced an increase in extracellular glutamate level in the dentate gyrus of WT mice at two different time phases. However, such a PTZ-induced increase in glutamate level was completely inhibited in SR-KO mice. The present findings suggest that SR may be a target for the development of new therapeutic strategies for epileptic seizures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、中枢神経系神経細胞の同期的で過剰な神経活動により発作症状が慢性的に反復出現する神経疾患である。その発症メカニズムのひとつに、興奮性神経伝達と抑制性神経伝達の均衡の破綻が考えられ、特に、中枢神経系において興奮性神経伝達を担うグルタミン酸による神経の過剰興奮が関与していることが示唆されている。

グルタミン酸受容体の一つである *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)型グルタミン酸受容体は生理的なシナプス伝達やシナプス可塑性に深く関わるだけでなく、海馬における同期的で過剰な神経活動の発現に重要な役割を果たし、てんかん病態との関連性が示唆されている (*Neurosci Lett* 414: 197-, 2007)。NMDA受容体を標的とした薬物は、てんかんによる神経機能障害に対する有力な治療方法として考えられており、NMDA受容体拮抗薬による抗てんかん効果が報告されている。しかし、NMDA受容体拮抗薬はその副作用も大きく、NMDA受容体の機能制御に関わる分子をターゲットとする新たな治療薬の開発が望まれている。

哺乳類動物の脳内に豊富に存在する D-セリンは、NMDA 受容体のグリシンサイトに結合し、内在性コ・アゴニストとして機能すると考えられている。しかし、NMDA 受容体のグリシン結合部位には、D-セリンのほかグリシンも結合することから、脳内 NMDA 受容体の機能制御に 2 つのコ・アゴニストがどのように関わっているかは明確ではなかった。この問題を解決するため、申請者らは C57BL/6 系統由来 ES 細胞を用いて、D-セリンの合成酵素であるセリンラセマーゼ (SR) 遺伝子のノックアウト (KO) マウスを作製し、脳内 D-セリ

ンの量が正常の 10%まで減少した SR-KO マウスの作製に成功した。この SR-KO マウスを用いて D-セリンが NMDA 受容体の主なコ・アゴニストとして NMDA 受容体を介する興奮性神経細胞死の制御に関わることを個体レベルで明らかにした。興奮性神経伝達の過剰活性化はてんかん病態にも深く関与している。しかし、NMDA 受容体の活性制御に関わる D-セリンが、てんかん病態においてどのような役割を果たしているかに関しては不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、野生型 (WT) ならびに SR-KO マウスに痙攣誘発物質であるペンチレンテトラゾール (PTZ) を投与し、PTZ により引き起こされる痙攣発作に対する感受性に脳内 D-セリン関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。さらに、痙攣発作に伴う細胞外グルタミン酸の遊離、神経細胞の活性化レベル、痙攣発作後のグリア細胞の活性化レベルと D-セリンの関連性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

①野生型 (WT) 及び SR-KO マウスに 35, 50 および 65mg/kg PTZ を投与し、痙攣発作が起きるまでの時間、持続時間および痙攣発作の重症度を検討した。

②PTZ 投与 2 時間後にマウス脳を採取し、PTZ 投与後の神経活動の興奮レベルを c-fos 染色により検討した。

③PTZ 投与 2 時間、三日後にマウス脳を採取し、アストロサイトおよびミクログリアの活性化・増殖レベルを検討した。

④海馬歯上回りにカニューレを留置し、自由行動下のマウスで microdialysis を行い、PTZ 投与前後の細胞外グルタミン酸および D-セリンの濃度を測定した。

4. 研究成果

①65 mg/kg PTZ 投与群では 46%の WT マウスで全般性 tonic-clonic 痙攣発作が観察されたが、SR-KO マウスでは全般性 tonic-clonic 痙攣発作が認められなかった。65 mg/kg および 50 mg/kg PTZ 投与群で、SR-KO マウスにおける痙攣発作の持続時間が WT マウスに比べ有意に短かった。一方、35mg/kg PTZ 投与群では、痙攣発作の程度並びに持続時間において、WT と SR-KO マウスの間で統計学的有意差が認められなかった。

②65 mg/kg PTZ 投与群では、PTZ 投与 2 時間後の大脳皮質、海馬 CA1、CA3 ならびに扁桃体における c-fos (神経活動の興奮レベルの指標) 発現細胞が WT マウスに比べ SR-KO マウスで有意に少なかった。50 mg/kg PTZ 投与群では、SR-KO マウスの大脳皮質における c-fos 発現細胞が WT マウスに比べ有意に少なかった。一方、35mg/kg PTZ 投与群では、WT と SR-KO マウスの c-fos 発現細胞数に有意差が認められなかった。

③PTZ 投与後のアストロサイトおよびミクログリアの活性化・増殖レベルについては、WT と SR-KO マウスの間で統計学的有意差が認められなかった。

④50 mg/kg PTZ 投与後の神経細胞の活性化レベルが一番高い脳領域である海馬歯状回りにカニューレを留置し、Microdialysis 行ったところ、WT マウスでは PTZ 投与後に細胞外グルタミン酸濃度が上昇するのに対し、SR-KO マウスでは PTZ 投与後の細胞外グルタミン酸濃度の増加が認められなかった。細胞外 D-セリンの濃度に関しては、WT および

SR-KO マウス両方とも PTZ 投与後に減少する傾向が認められたが、両群の間に有意差はなかった。

以上の結果から、SR-KO マウスでは脳内 D-セリンが欠乏により、痙攣発作後のグルタミン酸の細胞外遊離が抑制され、神経細胞の過剰活性化が起こりにくくなり、その結果、高濃度 PTZ 投与により誘発される全般性 tonic-clonic 痙攣など重症の痙攣に対する感受性が低下したことが考えられた。今後、SR や D-セリンをターゲットとする新規治療薬の開発が重症の痙攣発作の治療に役立つと考えられる。

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 3 件)

1. Horio M., Kohno M., Fujita Y., Ishima T., Inoue R., Mori H., Hashimoto K. Role of serine racemase in behavioral sensitization in mice after repeated administration of methamphetamine. PLoS One. 7: e35494, 2012 査読あり

2. Horio M., Kohno M., Fujita Y., Ishima T., Inoue R., Mori H., Hashimoto K. Levels of D-serine in the brain and peripheral organs of serine racemase (Srr) knock-out mice. Neurochem. Int. 59: 583-589, 2011. 査読あり

3. Mori H., Inoue R.: Serine racemase knockout mice. Chemistry & Biodiversity, 7: 1573-1578, 2010. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. 井上 蘭, 原井 朋美, 藤田 有子, 田中 亜由美, 堀尾 茉央, 橋本 謙二, 森 寿: ペンチレンテトラゾール誘発痙攣発作にお

ける D-セリンの機能解析. 第 34 回日本神経科学大会, 2011, 9, 14-17, 横浜.

2. 井上 蘭, 原井 朋美, 藤田 有子, 田中 亜由美, 堀尾 茉央, 橋本 謙二, 森 寿 : セリンラセマーゼノックアウトマウスではペンチレンテトラゾール急性投与により誘発される痙攣発作に関連した変化が抑制される. D-アミノ酸研究会学術講演会, 2011, 9, 9-10, 東京.

3. Inoue R., Harai T., Hashimoto K., Tanaka A., Mori H. : Pentylentetrazole-induced seizure is attenuated in serine racemase knockout mice. Society For Neuroscience's 40th annual meeting, 2010, 11, 13-17, San Diego, USA.

[図書] (計 2 件)

井上 蘭, 森 寿 : 「series モデル動物利用マニュアル」疾患モデルの作製と利用ー脳・神経疾患, セリンラセマーゼ欠損マウス. 189-194, 株式会社エル・アイ・シー, 2011.

Mori H., Inoue R. : Serine racemase knockout mice. D-Amino Acids in Chemistry, Lifesciences, and Biotechnology. p257-262, Brückner, H and Fujii, N. eds. Wiley-VCH, 2010.

[その他]
ホームページ等

<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/%E3%82%BB%E3%83%AA%E3%83%B3%E3%83%A9%E3%82%BB%E3%83%9F%E5%8C%96%E9%85%B5%E7%B4%A0>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 蘭 (Ran Inoue)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教
研究者番号 : 70401817

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし