

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460224

研究課題名(和文)統合失調症治療薬によるD-セリンの有効性向上効果の検討

研究課題名(英文)Effect of antipsychotics on efficacy of D-serine

研究代表者

福島 健 (FUKUSHIMA, Takeshi)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：00272485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症にD-アミノ酸の1つであるD-セリンの投与が有効である知見に基づき、本研究では統合失調症患者に処方されている抗精神病薬、気分安定薬などについて、生体内でD-セリンを分解するD-アミノ酸化酵素(DAO)の活性阻害作用を調べた結果、第二世代抗精神病薬リスペリドン(Ris)やブロナンセリンにDAO活性阻害作用が確認された。次に、ラットにD-セリンとRisを併用投与した結果、D-セリン単独投与時に比べ、Risを併用投与することで、ラット血漿および脳でのD-セリン濃度が有意に高くなることを発見した。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that D-serine administration with antipsychotics was effective for the treatment of schizophrenia. An inhibitory effect of D-amino acid oxidase (DAO) activity by several antipsychotics or mood stabilizer etc. was firstly investigated by in vitro experiment, and we found that second-generation antipsychotics, risperidone (Ris) and blonanserin revealed relatively intense inhibitory actions of in vitro DAO activity. Next, Ris followed by D-serine was administered intraperitoneally to rats, and the D-serine levels in rat plasma or brain (striatum) with or without Ris pretreatment were examined by HPLC with fluorescence detection. Consequently, D-serine levels in rat plasma and microdialysis sample from striatum in rat brain were significantly increased in rats pretreated with Ris.

研究分野：分析化学

キーワード：統合失調症 D-セリン リスペリドン マイクロダイアリス LC-MS/MS

1. 研究開始当初の背景

(1) D-セリンと統合失調症

統合失調症は、人口の約 1%が罹患する重篤な精神疾患であるが、その治療薬として現在、優れたものはない。現在の治療薬は、ドパミン (DA) 神経の受容体遮断作用により、同疾患の陽性症状 (幻覚、幻聴など) を緩和するが、陰性症状 (引きこもりや感情鈍磨など) や認知機能障害を改善しにくい¹⁾。しかし、1998 年に NMDA 受容体刺激作用を有する D-セリン (D-Ser) を同症治療薬とともに患者に併用投与した結果、陽性ならびに陰性症状、認知障害が減少したことが報告され²⁾、最近も同様の論文が公表されている。D-Ser は元々生体内に存在する D-アミノ酸である。

研究代表者は以前に生体内 D-Ser を定量可能な HPLC-蛍光検出法を開発し、この分析法を用いて、統合失調症患者の血清では D-Ser 濃度が有意に低いことを発見した³⁾。また、同患者脳脊髄液でも D-Ser 低下が報告され⁴⁾、これらの知見から、同患者脳内で D-Ser が欠乏しており、D-Ser の投与が同疾患に対して有効であると考えられる。

(2) D-セリンの問題点とその対処

一方で D-Ser は腎毒性物質であることが 1970 年代から報告されているため⁵⁾、国内では統合失調症患者への D-Ser の投与は行われていない。生体内の D-Ser は、肝臓、腎臓、脳などに存在する D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) により代謝分解されるが、統合失調症患者の死後脳では DAO 活性が健常人のものよりも上昇していた⁶⁾。生体内 DAO 活性を阻害できれば、毒性を生じない程度の D-Ser 少量投与であっても、D-Ser 濃度をより高く保つことが可能である。こうした背景から、国内外で DAO 活性阻害物質の合成研究が行われるようになったが⁷⁾、未だ開発途上であり、患者への使用例はない。

2. 研究の目的

(1) 上記の背景より、統合失調症患者に処方される幾つかの治療薬 (抗精神病薬、気分安定薬など) に生体内 DAO 活性を阻害する作用があるかどうか、すなわち主作用の他に DAO 活性阻害作用を有する治療薬を探索することにした。研究代表者は市販 DAO と発蛍光基質 D-キヌレニン (D-KYN)

を用いた *in vitro* 実験による DAO 活性阻害測定法を新規開発しており^{8,9)}、このアッセイ法により、統合失調症患者に処方される抗精神病薬および気分安定薬などの DAO 活性阻害作用を *in vitro* 実験で検討する。

(2) *in vitro* 実験で DAO 阻害作用を有する統合失調症の治療薬が、実際に *in vivo* で DAO 阻害効果により、D-Ser の生体内、特に血漿中 D-Ser 濃度の上昇および脳内高濃度維持に寄与するかどうか、実験動物 (ラット) を用いた前臨床試験を行う。

3. 研究の方法

(1) 抗精神病薬の DAO 活性阻害作用

① バッチ法による検討

0.4 M トリス緩衝液 (pH 8.3) 中でヒト DAO、BSA、FAD の存在下にて、様々な濃度に調製した抗精神病薬および気分安定薬を添加し、37 °C でプレインキュベートした。次に、基質として 7.0 mM D-KYN を加え、60 分間インキュベート後、0.3 M 硫酸亜鉛を加えて、生成したキヌレン酸 (KYNA) の蛍光強度 (ex. 250 nm, em. 394 nm) を測定した。

② HPLC による検討

被験薬物が蛍光を有する場合は、HPLC-蛍光検出器を用いる KYNA の定量法により、その生成を調べた。HPLC には HILIC 型カラム (2.5 μm, 2.0 mm I.D. × 150 mm) を使い、移動相に CH₃CN/10 mM HCO₂NH₄ in H₂O (pH 3.0) (60/40) を使用した。流速 0.4 mL/min、Ex. 250 nm、Em. 398 nm で蛍光検出した。DAO の酵素反応は①と同様に行った後、内標準物質 (IS) として 100 μM Cl-KYNA を加え、除タンパクし、試料を調製した。HPLC には 試料 20 μL を注入した。

(2) 第二世代抗精神病薬 (リスペリドン) と D-Ser 併用投与の *in vivo* 実験

① ラット血漿中 D-Ser 濃度の変動

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (9 週齢) に Ris (0.5, 1.0, 3.0 mg/kg) または PBS (Control 群) を腹腔内投与後 30 分に D-Ser (20 mg/kg) を投与し、経時的に採血して血漿を得た。回収した血漿中 D-Ser 濃度を除く

ンパクし、蛍光試薬 NBD-F による蛍光誘導体化後、HPLC を用いて測定した。

② ラット血漿中リスペリドン (Ris) および代謝物 9-ヒドロキシリスペリドン (9-OHRis) 濃度推移

Ris 及び 9-OHRis は Tolperisone を IS として用いた。血漿試料を除タンパク後、固相抽出 (InertSep C₁₈) を行い、LC-MS/MS [カラム: InertSustain C₁₈ (100 × 2.1 mm, 3 μm)] により測定し、それらの濃度推移を調べた。

③ リアルタイム PCR による DAO mRNA 発現変動

常法¹⁰⁾に従い、Ris (3 mg/kg) 投与後のラット小脳および腎臓中の DAO mRNA 発現をリアルタイム PCR により測定した。尚、コントロールとして Ris の代わりに PBS を投与したラットを使用した。

④ ラット線条体マイクロダイアリシス (MD) 実験

長時間麻酔下にてラット線条体にガイドカニューラを埋め込み、2 日間通常飼育後、ブレインプローブを挿入し、無麻酔非拘束の条件下で 30 分毎に脳透析液を氷冷下にて回収した。尚、本実験は、本学動物実験委員会により承認を得ている (14-53-165)。回収開始から 1.5 時間後に Ris (0, 1.0, 3.0 mg/kg)、その 30 分後に D-Ser (50 mg/kg) を投与し、回収された脳透析液 (MD) サンプル中 D-Ser および神経伝達物質を HPLC により定量した。回収された MD サンプル中ドパミン (DA) 及びホモバニリン酸 (HVA) 濃度を HPLC-電気化学検出法により測定した。

4. 研究成果

(1) 抗精神病薬の DAO 活性阻害作用

① バッチ法による検討

統合失調症患者に処方される治療薬に、体内 DAO 活性の阻害作用が有るかどうかを、当研究室で開発した DAO 活性阻害の *in vitro* アッセイ法により評価した。ヒト DAO を用いて、その治療薬の DAO 活性阻害作用を調べた結果、第一世代抗精神病薬であるクロロプロマジン、ハロペリドール、スルピリド、第二世代抗精神病薬であるアリピプラゾー

ル、クエチアピン、リスペリドン (Ris) およびブロナンセリン (Blo) にヒト DAO 活性阻害作用が認められ、特に Ris および Blo に強いヒト DAO 活性阻害作用が確認された (IC₅₀ 値: 約 4~5 μM)。一方、同患者に処方される抗パーキンソン病薬 (トリヘキシフェニジル、ビベリデン)、抗うつ薬 (セルトラリン、エスシタロプラム、デュロキセチン)、気分安定薬 (バルプロ酸ナトリウム) の IC₅₀ 値は 50 μM 以上であり、これらの薬物の DAO 活性阻害は弱いと考えられた。

② HPLC による検討

蛍光を有する被験薬物の DAO 活性阻害を評価できるアッセイ法として、HPLC を用いて分離した KYNA のピーク面積変化により評価できる蛍光アッセイ法を構築した。

得られたクロマトグラム (図 1) では、CI-KYNA (IS) と KYNA のピークがそれぞれ約 9, 12 分に溶出し、ピーク面積比算出が可能であった。本 HPLC 法を用いて、被検物質の DAO 活性阻害作用を濃度-阻害曲線により求めた結果、DAO 活性阻害物質 3,5-MPC は濃度依存的に KYNA の生成を抑えることが確認された。一方、検討した蛍光を有する中枢作用薬 (トラゾドン、イミプラミン、ペロスピロン) の DAO 活性阻害作用は 3,5-MPC に比べて僅かであった。

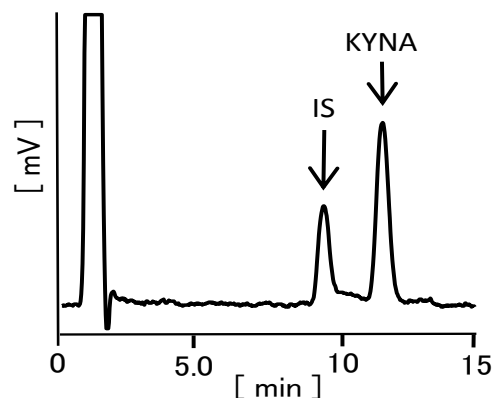


図1 DAOによる酵素反応混合物のクロマトグラム (HPLC 条件は3 (1) ②に記載した。)

(2) 第二世代抗精神病薬 (リスペリドン) と D-Ser 併用投与の *in vivo* 実験

① ラット血漿中 D-Ser 濃度の変動

以降の実験では、DAO 活性の阻害作用が見られた第二世代抗精神病薬リスペリドン (Ris) を使用した。SD 系雄性ラットに Ris を腹腔内投与 (*i.p.*) し、その 30 分後に D-Ser を投与することで、Ris による血漿中 D-Ser 濃度の変動を調べた結果、投与された D-Ser の血漿中濃度の全体的な上昇 (図 2) およびその濃度曲線下面積 (AUC) の上昇 (図 3) が見られた。血漿中 D-Ser 濃度及びその AUC は Ris の投与量依存的に増大し、Ris 1.0、3.0 mg/kg において Control 群に比べ有意な差が認められた。これらの結果より、Ris の投与により血漿中 D-Ser 濃度及び AUC を増加させることが推察された。また、この効果は、Ris の代わりに D-Ser の代謝酵素である DAO の活性阻害物質である MPC の投与 (1.0 mg/kg, *i.p.*) によっても、同様の傾向が見られた。以上より、Ris は生体内においても D-Ser の代謝分解を抑える可能性が示唆された。

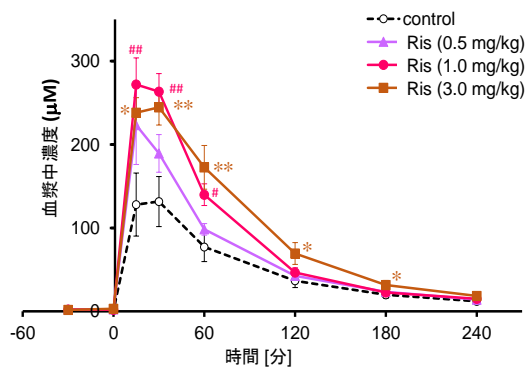


図 2 Ris および D-Ser 併用投与時のラット血漿中 D-Ser 濃度推移 (*, #: $p < 0.05$, **, ##: $p < 0.01$)

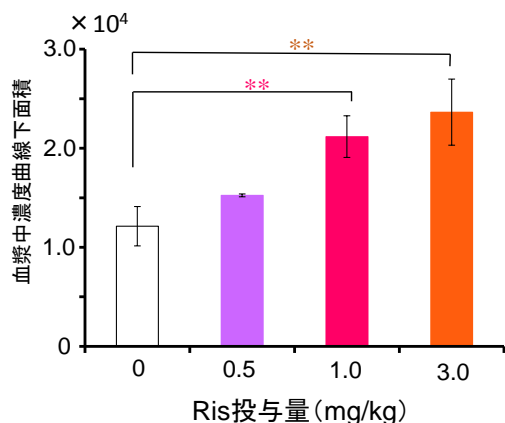


図 3 Ris および D-Ser 併用投与時のラット血漿中 D-Ser 濃度-時間曲線下面積 (**: $p < 0.01$)

② ラット血漿中リスペリドン (Ris) および代謝物 9-ヒドロキシリスペリドン (9-OHRis) 濃度推移

ラット血漿試料の前処理操作において、Ris、9-OHRis、IS の固相抽出では、酸性の洗浄液 (2% ACN/0.1% HCO₂H in H₂O) と溶出液 (60% ACN/0.1% HCO₂H in H₂O) の使用時が最も高い回収率であった。移動相に 20% ACN/10 mM HCO₂NH₄ in H₂O (pH 3.0)を用いた LC-MS/MS により、Ris、9-OHRis、IS のピークが 10 分以内に溶出し、十分な分離が得られた。血漿中 Ris および 9-OHRis 濃度は共に投与量を反映した推移を示した (図 4)。Ris、9-OH Ris は血漿中に長い時間、存在することがわかり、Ris および 9-OHRis が DAO 活性を阻害し、D-Ser 濃度が高く維持されることが推測された。

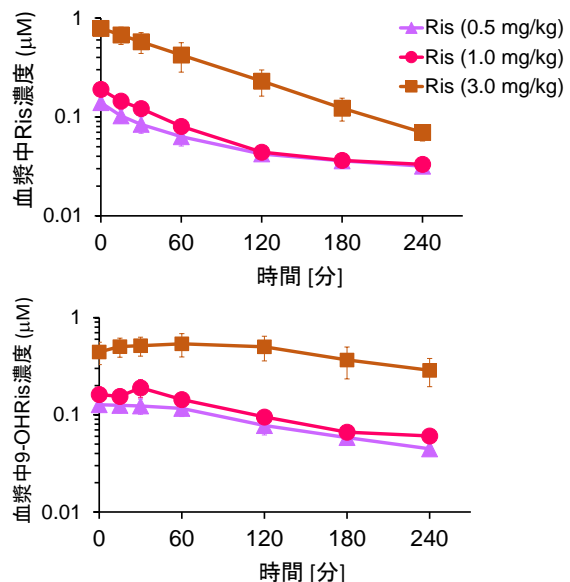


図 4 Ris 投与時のラット血漿中 Ris (上図) および 9-OHRis (下図) 濃度推移

③ リアルタイム PCR による DAO mRNA 発現変動

リアルタイム PCR の常法に従い、ラット小脳および腎臓中の DAO mRNA 発現を調べた結果、Ris の投与による DAO mRNA 発現の有意な変動は見られなかった。したがって、図 2, 3 で見られた Ris 投与による D-Ser 濃度の上昇は、DAO 発現抑制ではなく、DAO 活性の阻害作用、あるいは Ris 及び主代謝物の 9-OHRis が有する循環器系への薬理作用の寄与が推察された。

④ ラット線条体マイクロダイアリシス (MD) 実験

D-Ser の血液から脳組織への分布、移行への変動を調べるために、実験動物 (ラット) が生きている状態での脳組織への物質変動を調べることができるラット脳マイクロダイアリシス (MD) 実験を行った。Ris、D-Ser の併用投与による脳内 D-Ser 濃度の変動を調べた結果、D-Ser の投与後 0.5、1.0 時間の時点において、Ris 投与群の方が D-Ser の脳への移行 (脳内 D-Ser 濃度) に有意な増加が見られた (図 5)。

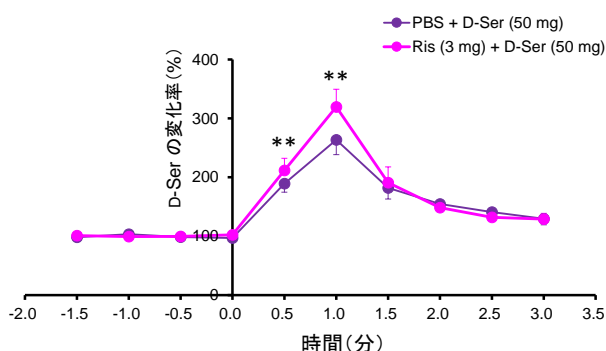


図 5 Ris および D-Ser 併用投与時のラット線条体 MD サンプル中 D-Ser 濃度の変動推移 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

一方、DA 及び HVA の変動に関しては、Ris 非投与群では、D-Ser 投与の有無に依らず DA 及び HVA 濃度の顕著な変動はなかったが、Ris + D-Ser 投与群では、1.0 mg/kg と 3.0 mg/kg 投与群との間で Ris 投与 0.5–2.5 時間後までの DA 濃度が有意に上昇していた。

また、DA、HVA 共に Ris 投与量依存的に AUC が増大し、いずれもコントロール群に対して有意に増加したが、D-Ser 投与の有無による差異はなかった。しかし、Ris 3.0 mg/kg 投与群では、Ris 投与 1.0–3.0 時間後において D-Ser 併用群の方が HVA/DA 比が増大していた。これらの結果から、D-Ser の併用投与により DA から HVA への代謝が亢進する可能性が示唆された。

本研究により、Ris と D-Ser を統合失調症患者へ併用処方する上で、臨床上重要な以下の知見が得られた。

Ris の投与量依存的に D-Ser の血漿中濃度の上昇が見られた。また、脳内においても、Ris による D-Ser の脳内移行性の上昇が見られたことから、Ris 服用患者では、D-Ser の投与量

を海外で試験されている投与量よりも少なくできる可能性が示唆された。今後は、前臨床試験として、Ris および D-Ser の併用投与時での行動薬理実験による検討が必要である。

<引用文献>

- 1) Tandon R., *J Clin Psychiatry* 2011, 72, 4-8.
- 2) Tsai GC., et al., *Biol Psychiatry* 1998, 44, 1081-1089.
- 3) Hashimoto K. et al., *Arch Gen Psychiatry* 2003, 60, 572-576.
- 4) Hashimoto K. et al., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr* 2005, 29, 767-769.
- 5) Ganote CE., et al., *Am J Pathol* 1974, 77, 269-282.
- 6) Madeira C. et al., *Schizophrenia Res* 2008, 101, 76-83.
- 7) Ferraris DV. and Tsukamoto T. *Curr Pharm Des* 2011, 17, 103-111.
- 8) Song Z. et al., *J Health Sci* 56: 341-346, 2010.
- 9) Iwasa S. et al., *Yakugaku Zasshi* 2011, 131, 1111-1116.
- 10) Nishiguchi Y. et al., *Int J Anal Bio-Sci* 2013, 1, 37-44.

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)

1. Iwasaki M, Kashiwaguma Y, Nagashima C, Izumi M, Uekusa A, Iwasa S, Onozato M, Ichiba H, Fukushima T: A high-performance liquid chromatography assay with a triazole-bonded column for evaluation of D-amino acid oxidase activity. *Biomed Chromatogr.* 30: 384-389, 2016. 査読有 DOI: 10.1002/bmc.3559

2. Shishikura M, Hakariya H, Iwasa S, Yoshio T, Ichiba H, Yorita K, Fukui K, Fukushima T: Evaluation of human D-amino acid oxidase inhibition by anti-psychotic drugs in vitro. *Biosci Trends.* 8: 149-154, 2014. 査読有 DOI: 10.5582/bst.2014.01034

[学会発表] (計 9 件)

1. 小野里 磨優, 福本 実理, 中澤 宏実,

石丸 勝之, 永嶋 千紘, 飯塚 英昭, 一場 秀章, 福島 健: D-セリンによるリスペリドン誘発ドパミン放出ならびに代謝への影響: ラット脳線条体マイクロダイアリシスによる検討 日本薬学会第 136 年会 2016. 03. 27. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

2. 小野里 磨優, 石丸 勝之, 永嶋 千紘, 福本 実理, 飯塚 英昭, 一場 秀章, 福島 健: S-Methyl-L-cysteine (SMLC) と D-セリン併用投与によるラット線条体 SMLC 及び D-セリンの変動解析 日本薬学会第 136 年会 2016. 03. 27. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

3. 中澤 宏実, 小野里 磨優, 秤屋 瞳, 永嶋 千紘, 飯塚 英昭, 一場 秀章, 福島 健: 抗精神病薬リスペリドンと D-Ser の併用投与によるラット血漿中 D-Ser 濃度の変動解析 日本薬学会第 136 年会 2016. 03. 27. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

4. 小野里 磨優, 石丸 勝之, 永嶋 千紘, 福本 実理, 飯塚 英昭, 一場 秀章, 福島 健: S-Methyl-L-cysteine (SMLC) 投与によるラット線条体 SMLC 及び D-セリンの変動解析 第 12 回東邦大学 4 学部合同学術集会 2016. 03. 12. 東邦大学医学部 3 号館 (東京都・大田区)

5. 永嶋千紘, 宍倉美穂, 石丸勝之, 秤屋 瞳, 小野里磨優, 飯塚英昭, 一場秀章, 福島 健: リスペリドンおよび D-セリン併用投与による D-セリンおよび神経伝達物質の変動解析 日本薬学会第 135 年会 2015. 03. 26. デザイン・クリエイティブセンター神戸 (兵庫県・神戸市)

6. 岩崎 恵, 小野里磨優, 永嶋千紘, 柏熊快之, 飯塚英昭, 一場秀章, 福島 健: HPLC-蛍光アッセイ法による中枢作用薬の D-アミノ酸オキシターゼ阻害作用の評価 日本薬学会第 135 年会 2015. 03. 26. デザイン・クリエイティブセンター神戸 (兵庫県・神戸市)

7. 宍倉美穂, 柏熊快之, 秤屋 瞳, 岩佐澄子, 一場 秀章, 吉尾 隆, 頼田和子, 福井 清, 福島 健: 統合失調症治療薬のヒト DAO 活性阻害作用の評価: in vitro 実験による検討 日本薬学会第 134 年会 2014. 03. 30. 熊本市総合体育館 (熊本県・熊本市)

8. 福島 健, 宍倉美穂, 岩佐澄子, 吉尾 隆,

一場秀章, 頼田和子, 福井 清: ヒト DAAO 活性阻害評価の in vitro アッセイ法—統合失調症治療薬の阻害作用—第 23 回 日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回 日本神経精神薬理学会合同年会 2013. 10. 25. 沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)

9. 宍倉美穂, 秤屋 瞳, 岩佐澄子, 吉尾 隆, 一場秀章, 頼田和子, 福井 清, 福島 健: 統合失調症治療薬のヒト DAAO 活性阻害作用の評価: in vitro 実験による検討 第 26 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2013) 2013. 08. 02. 昭和大学薬学部 (東京都・品川区)

[その他]

ホームページ

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/phar/Analchem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 健 (FUKUSHIMA, Takeshi)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号: 00272485

(2) 研究分担者

西口 慶一 (NISHIGUCHI, Yoshikazu)

東邦大学・薬学部・助教

研究者番号: 60459823