

Award Accounts

第1回 D-アミノ酸研究会奨励賞

D-セリン代謝異常と筋萎縮性側索硬化症

笹部 潤平

慶應義塾大学 医学部解剖学

1. はじめに

哺乳類の中枢神経系（特に前脳領域）には、L-セリンの 1/3 量程度の D-セリンが存在する。D-セリンは、グルタミン酸のイオンチャネル型受容体の一つである N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体のコアゴニストとして、グルタミン酸による神経伝達に重要な働きをしていることが明らかになってきた⁽¹⁾。NMDA 受容体へのコアゴニストの結合は、NMDA 受容体の活性に不可欠であるのみならず、グルタミン酸と NMDA 受容体の親和性の増加⁽²⁾、脱感作の減少⁽³⁾、受容体の代謝促進⁽⁴⁾にも関与し、NMDA 受容体の調節に必須の役割を担っている。このため、D-セリンは生理的に情動・認知機能・運動記憶に関与するのみならず、NMDA 受容体の活動異常やグルタミン酸興奮毒性が関わるとされている精神疾患や神経疾患においても重要であると考えられてきている。

近年、運動神経疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) において、D-アミノ酸代謝異常との関連を示唆する知見が集まってきている。ALS では、以前よりグルタミン酸による神経興奮毒性が運動神経変性の原因の一つと考えられてきたことから、D-セリン代謝異常は NMDA 受容体を介して病態へ関与するのではないかと考えられる。本稿では最近の知見を含めて ALS 病態生理における

D-セリン代謝異常について概説する。

2. D-セリンと ALS

2. 1. ALS とは

ALS は、最も頻度の高い成人発症の運動神経疾患である。10 万人に数人の罹患率で、生涯リスクは約 500 人に1人である。脊髄、脳幹、大脳皮質における下位および上位運動神経細胞の選択的な変性および脱落に伴い、急速に筋萎縮および筋力低下が進行し、発症後平均 3 から 5 年という短い期間で呼吸筋麻痺にまで至ってしまう。特徴的な病理所見としては、運動神経の変性・脱落、細胞内凝集体の形成、変性した運動神経周囲のグリア細胞の活性化である。現在、唯一認可となっている治療薬は、グルタミン酸放出阻害薬 (riluzole) であるが、臨床的に数ヶ月延命作用を認めるのみで治療効果に乏しい。このため、現状は主に支持療法に頼らざるを得ない状況であり、病状の進行を食い止める根治的治療法の開発が待たれている。

これまでに多くの病態仮説に基づいて治療薬シードが開発されてきたものの、臨床試験の芳しい結果は得られてこなかった。最近では、riluzole と構造が類似する dexpramipexol が第 III 相試験で良好な結果を示しており期待されている⁽⁵⁾。

2. 2. ALS の病態生理

ALS は孤発性が 95%であり、5%は家族性に発症することが知られている。孤発例は因果関係が明らかな原因が同定されていないため、家族性 ALS を中心にこれまで研究が進められている。家族性 ALS 全体の約 20%を占める Cu/Zn-superoxide dismutase 1 (SOD1)の変異が最初に発見され、SOD1 変異体は孤発性 ALS に酷似した臨床症状をもたらす⁽⁶⁾。その臨床症状の類似性と変異 SOD1 動物モデルが典型的な ALS 様の表現型を有することから⁽⁷⁾、変異 SOD1 による選択的運動神経細胞死機構から孤発性 ALS の病態理解が試みられてきた。酸化ストレス、ミトコンドリア機能不全、活性化グリア細胞による毒性、グルタミン酸神経興奮毒性などが運動神経変性の病態仮説として知られている⁽⁶⁾。現在の唯一の認可薬 (riluzole) はグルタミン酸神経興奮毒性を軽減することを目的とする。

現在までに少なくとも 15 の家族性 ALS 原因遺伝子が同定されている。新たに発見されたいくつかの原因遺伝子 (TAR DNA binding protein (TARDBP)、fused in sarcoma (FUS)、C9ORF72) による家族性 ALS において、孤発性 ALS との共通点が見い出され、TDP-43 を含む細胞内凝集体が近年注目を浴びている^(8,9)が、この凝集体による運動神経変性メカニズムの詳細は明らかになっていない。また、変異 SOD1 による家族性 ALS の運動神経細胞には TDP-43 陽性の凝集体は認められず、ALS 発症メカニズムの多因子性が伺える。

2. 3. ALS における運動神経興奮毒性

ALS では、グリア細胞におけるグルタミン酸トランスポーターの発現が脊髄前角で減少することが知られている⁽⁶⁾。シナプス内のグルタミン酸濃度調節は、グルタミン酸トランスポーターによって主に行われているため、ALS ではシナプス内グルタミン酸濃度が上昇して神経興奮毒性を引き起こすと考えられている。神経興奮毒性はイオンチャネル型グルタミン酸受容体を介して、細胞内への過剰な Ca^{2+} 流入によって起こる。イオンチャネル型グルタミン酸受容体

(NMDA 受容体、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)受容体、カイン酸受容体) の中でも、 Ca^{2+} 流入を阻害する GluR2 サブユニットを有さない AMPA 受容体が運動神経に多いことから、ALS では AMPA 受容体が注目を浴びてきた⁽¹⁰⁾。一方で、NMDA 受容体は Ca^{2+} 透過性は高いものの脊髄には比較的発現が低いため、ほとんど注目されてこなかったが、NMDA 受容体拮抗薬であるメマンチンが変異 SOD1 動物モデルに対して症状の進行抑制効果があることが報告され⁽¹¹⁾、NMDA 受容体と病態との関連が示唆されてきている。我々は、D-セリンが孤発性 ALS 患者および変異 SOD1 動物モデルの脊髄前角で蓄積することを発見し、ALS での運動神経変性に NMDA 受容体の活性化を介した興奮毒性も病態生理的に重要であることを示した⁽¹²⁾。

2. 4. 脊髄 D-セリン調節

D-セリンは齧歯類では前脳に主に存在し、小脳以下の脳幹や脊髄では相対的に低い濃度でしか存在しない。これは合成酵素のセリンラセマーゼ(SR)が前脳に多く発現すること、分解酵素の D-アミノ酸酸化酵素(DAO)が後脳・脊髄を中心に発現することに起因する。脊髄では、生理的には SR は脊髄後角に存在する介在神経に比較的多く発現するものの前角の神経細胞では発現に乏しい (未発表データ)。一方で、脊髄中の DAO は前索 (腹側白質) および前角の腹内側のアストログリアで最も活性が高く、運動神経細胞には活性を認めない⁽¹³⁾。このような分布から、生理的条件下の脊髄では D-セリンは腹側には少なく、背側脊髄に相対的に多く存在すると考えられる。尚、ヒト脊髄における D-セリンの分布については明らかになっていない。

生理的には D-セリンの乏しい脊髄運動神経細胞にも、NMDA 受容体の発現は認められる⁽¹⁴⁾。脊髄神経細胞の NMDA 受容体のコアゴニスト部には脊髄に豊富なグリシンが結合して制御していると考えられてきたが、脊髄内での D-セリン量が増加する G181R 変異 DAO マウスでは、脊髄背側神経細胞で NMDA 受容体を介したシ

ナプス伝達が増強する⁽¹⁵⁾。このことは、D-セリンは NMDA 受容体への親和性がグリシンよりも高いことを示しており、圧倒的に豊富なグリシン存在下でも D-セリン量の増加は NMDA 受容体を活性化へ導くと考えられる。

2. 5. ALS における D-セリン代謝異常

孤発性 ALS 患者および変異 SOD1 による ALS 動物モデルの脊髄前角で D-セリンの蓄積を発見し、主に動物モデルを使ってその蓄積メカニズムを我々は検討してきた。変異 SOD1 マウスにおける脊髄 D-セリン蓄積には、いくつかの要因が関与している。

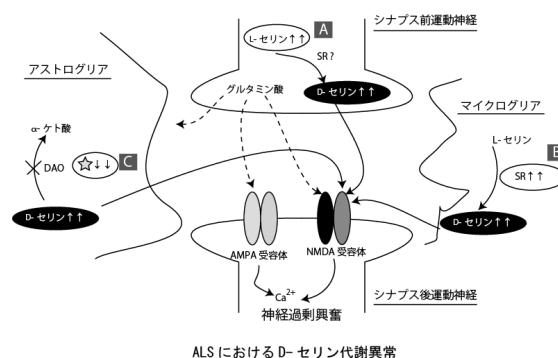
まず、第一に SR の基質となる L-セリン量の増加である。ALS モデルマウスの一つである G37R 変異 SOD1 マウスでは、L-セリン合成酵素である 3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼの発現が神経細胞で上昇することが知られている⁽¹⁶⁾。さらに、G93A 変異 SOD1 マウスでは運動神経変性の発症後に脊髄中に L-セリンが増加することを我々も確認している⁽¹⁷⁾ (図中 A)。

第二に合成酵素である SR の発現上昇である。SR の発現は運動神経変性の進行に伴うミクログリアの活性化に由ると考えられる。ミクログリアでは、炎症に伴い JNK/AP-1 の系が活性化することで SR の発現が増加することが知られており⁽¹⁷⁾、G93A 変異 SOD1 マウスでも、変性した運動神経細胞周囲にミクログリアが活性化し、JNK のリン酸化が亢進する⁽¹²⁾。実際、脊髄前角の SR 陽性ミクログリアの数は、G93A 変異 SOD1 マウスおよび孤発性ヒト ALS 患者脊髄で顕著に増加する⁽¹²⁾ (図中 B)。

第三に分解酵素 DAO の発現および活性低下が D-セリン蓄積に寄与する。G93A 変異 SOD1 マウスにおける DAO 活性を D-プロリンを基質とした酵素組織染色法で検出すると、網様体脊髄路に相当する脳幹網様体/脊髄前索・前角において顕著に染色性が低下する⁽¹³⁾。ALS の病巣ではアストログリアもミクログリアと同様に活性化することが知られているが、DAO 活性は活性化アストログリアでは全く認められない⁽¹³⁾。脊髄全体の DAO 活性は野生型の 1/2 程度まで低

下し、mRNA・タンパク量ともに有意に減少することから⁽¹³⁾、正常アストログリアの減少と活性化アストログリアの増加に伴って DAO 発現が失われたものと考えられる (図中 C)。

組織中 D-セリン量は合成と分解のバランスによって決定されるが、DAO 活性を欠損させた変異 SOD1 マウスを用いた検討から判断すると、上記の要因のうち DAO による分解の低下が ALS での D-セリン蓄積に最も重要であろうと思われる⁽¹³⁾。



2. 6. DAO の遺伝子変異と家族性 ALS

DAO の活性低下は、変異 SOD1 マウス脊髄での D-セリン蓄積の主たる要因であると同時に、ヒト ALS でも重要であることが近年明らかとなった。

3 世代 6 名の家族性 ALS 患者のゲノムスクリーニングで、DAO 遺伝子の R199W 変異が新規の家族性 ALS の原因として同定された⁽¹⁸⁾。DAO 遺伝子変異による家族性 ALS は、中年発症で典型的な ALS 症状を示す。Arg199 は種保存的なアミノ酸で、DAO の FAD と基質結合部位の近傍に存在し、R199W 変異は DAO 活性をほぼ完全に喪失させる⁽¹³⁾、⁽¹⁸⁾。R199W は dominant negative 変異で野生型 DAO の活性を阻害すると考えられており⁽¹⁸⁾、実際、変異 DAO による家族性 ALS は常染色体優性遺伝形式で発症する。

変異 DAO 家族性 ALS では、TDP-43 陽性の凝集体を認めず、D-セリンの蓄積も含めてどのようなメカニズムで運動神経変性が起こるかは今後のさらなる検討が待たれるが、D-アミノ酸代謝異常と ALS 発症に密接な因果関係があるこ

とが疑われる。

2. 7. D-セリン蓄積と ALS 病勢

脊髄中の D-セリン蓄積は運動神経変性を増悪させることが *in vitro* および *in vivo* の研究で示唆されている。変異 SOD1 マウス由来の初代培養運動神経細胞は野生型運動神経細胞と比較して、NMDA 刺激に対して脆弱であり、さらに D-セリン量依存的にその脆弱性が増強する⁽¹⁸⁾。D-セリンに対する脆弱性は NR1 サブユニットの D-セリン結合部位に対する阻害剤で抑制されることから⁽¹²⁾、D-セリン蓄積は NMDA 受容体の活性化を介して運動神経細胞死を増悪すると考えられる。さらに、SRR ノックアウト変異 SOD1 マウスでは脊髄中の D-セリン増加が抑制され、病勢の改善によって寿命が有意に延長することが近年報告された⁽¹⁹⁾。しかしながら、このマウスでは ALS の発症が通常の変異 SOD1 マウスと比較して早まるとされており⁽¹⁹⁾、D-セリン蓄積は単に運動神経変性を増悪させるのみではなく、病態へ複雑に関与している可能性が考えられる。

3. おわりに

本稿では、D-セリン代謝異常の ALS への関与について述べた。孤発性 ALS は発症や進行が様々であることから多因子疾患である可能性が高く、症状や進行による詳細な分類が必要であり、分類に応じた治療標的の開発が新規治療法の確立には不可欠であると考えられる。D-セリン代謝異常がどのようなグループの ALS に関与するか、今後慎重かつ詳細な検討が進められる必要があるが、D-セリンを標的とした治療が一部の ALS の病勢を抑制できるのではないかと期待している。D-セリン合成阻害や取り込み促進は、前脳の神経細胞の生理機能に大きく影響を与える可能性が高いため、後脳や脊髄に多い DAO に焦点をあてて D-セリン分解を亢進させるような戦略が重要であるのではないかと考えられる。

文 献

1. Wolosker H, Dumin E, Balan L, & Foltyn VN. 2008. D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *FEBS J* 275:3514-3526
2. Fadda E, Danysz W, Wroblewski JT, & Costa E. 1988. Glycine and D-serine increase the affinity of N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate binding sites in rat brain synaptic membranes. *Neuropharmacology* 27:1183-1185.
3. Lerma J, Zukin RS, & Bennett MV. 1990. Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes and is required for NMDA responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2354-2358.
4. Nong Y, *et al.* 2003. Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature* 422:302-307.
5. Cudkovic M, *et al.* 2011. The effects of dex pramipexole (KNS-760704) in individuALS with amyotrophic laterALSclerosis. *Nat Med* 17:1652-1656.
6. Bruijn LI, Miller TM, & Cleveland DW. 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27:723-749.
7. Gurney ME. 1994. Transgenic-mouse model of amyotrophic laterALSclerosis. *N Engl J Med* 331:1721-1722.
8. Ince PG, *et al.* 2011. Molecular pathology and genetic advances in amyotrophic laterALSclerosis: an emerging molecular pathway and the significance of glial pathology. *Acta Neuropathol* 122:657-671.
9. Ludolph AC, Brettschneider J, & Weishaupt JH. 2012. Amyotrophic laterALSclerosis. *Curr Opin Neurol* 25:530-535.
10. Van Damme P, Dewil M, Robberecht W, & Van Den Bosch L. 2005. Excitotoxicity and amyotrophic laterALSclerosis. *Neurodegener*

Dis 2:147-159.

11. Wang R & Zhang D. 2005. Memantine prolongs survival in an amyotrophic laterALSclerosis mouse model. *Eur J Neurosci* 22:2376-2380.
12. Sasabe J, *et al.* 2007. D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic laterALSclerosis. *EMBO J* 26:4149-4159.
13. Sasabe J, *et al.* 2012. D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:627-632.
14. Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, & Feldman JL. 2000. Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev* 80:767-852.
15. Wake K, *et al.* 2001. Exaggerated responses to chronic nociceptive stimuli and enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in mutant mice lacking D-amino-acid oxidase. *Neurosci Lett* 297:25-28.
16. Lobsiger CS, Boillee S, & Cleveland DW. 2007. Toxicity from different SOD1 mutants dysregulates the complement system and the neuronal regenerative response in ALS motor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7319-7326.
17. Wu S & Barger SW. 2004. Induction of serine racemase by inflammatory stimuli is dependent on AP-1. *Ann N Y Acad Sci* 1035:133-146.
18. Mitchell J, *et al.* 2010. Familial amyotrophic laterALSclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7556-7561.
19. Thompson M, *et al.* 2012. Paradoxical roles of serine racemase and D-serine in the G93A mSOD1 mouse model of amyotrophic laterALSclerosis. *J Neurochem* 120:598-610.



笹部 潤平 (ささべ じゅんぺい) 氏
略 歴

1996-2002 慶應義塾大学医学部
2002-2004 慶應義塾大学病院内科学研修
2004-2008 慶應義塾大学大学院医学研究科
博士課程
2008-2010 慶應義塾大学医学部解剖学
特別研究助教
2010-現在 慶應義塾大学医学部解剖学
助教