

I. セリンラセマーゼ (SR) を標的とした 神経変性疾患治療薬の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 分子神経科学講座 教授 森 寿

【各班のまとめ】

高齢化を迎えている現代社会では、痴呆、記憶障害、情動障害などの原因となる神経変性疾患に対する治療薬を開発する事が、社会保健の観点や高齢者の生活の質を保持する観点から、医学的、社会的に解決すべき重要な課題である。現在いくつかの神経変性疾患に対する治療薬が開発されつつあるが、いまだ十分とは言えない。新たな神経変性疾患治療薬の開発は、高齢化を迎える社会において非常に大きな市場ニーズがある。

脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病などでは、神経細胞死に伴う過剰なグルタミン酸の放出と、それに伴う NMDA 型グルタミン酸受容体 (GluR) の過剰活性化が、神経変性疾患の進展に関わる共通機構と考えられている。研究代表者の森らは、NMDA 型 GluR の作動を制御する内在性コアゴニストとしての D-セリンの役割に注目し、D-セリンの産生に関わるセリンラセマーゼ (SR) の遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作製し、その機能解析を進めて来た。その結果、SR-KO マウスは、神経細胞死を引き起こす NMDA、あるいはアルツハイマー病の原因のひとつと考えられている A β ペプチドの脳内投与による興奮毒性に対して、抵抗性を示す事を明らかにした (Inoue et al., 2008)。また、他の研究グループの SR-KO マウスを用いた研究により、実験的脳梗塞による神経細胞死に対しても抵抗性を示す事も明らかにされている (Mustafa et al., 2010; Wolosker and Mori, 2012)。さらに、井上、森らは、抑制性神経伝達を阻害するペンチレンテトラゾール (PTZ) 投与で誘発される全般性てんかん発作が、SR-KO マウスで軽減すること、PTZ 投与後の神経細胞の活性化状態を示す分子マーカーのひとつである c-Fos タンパク質の発現誘導が大脳皮質や海馬等で減少していること、海馬歯状回で PTZ 誘発性の細胞外グルタミン酸濃度の上昇が生じないこと等を見出し報告した (Harai et al, 2012)。従って SR は、ヒトで生涯発症率が 0.5-1 % と報告されているてんかん発作軽減のあらたな薬物標的となる可能性も示唆された。このように、SR により生産される D-セリンは、NMDA 受容体の過剰活性化状況において大きく関与している可能性が示唆され、SR の阻害薬は、神経変性疾患やてんかん発作の新たな治療薬となりうると考えられる。

本研究では、班員のそれぞれ専門分野での研究手法を活かし、1) ヒト SR に対する新たな阻害薬候補の詳細な活性測定を *in vitro* の系で行い、SR 阻害薬のリード化合物を決定する。また、本学の和

漢医薬学総合研究所から共同研究として提供される和漢薬資源の中からSRに作用する薬物候補のスクリーニングを進める(森)。2) マウスSRをヒトSRに入れ替えたヒト型SRを持つマウス系統を複製し、ヒトSRに対する阻害薬の効果をin vivoで検証する(井上)。3) 阻害薬候補に化学的修飾を行い、特異性が高く、脳透過性を高めた新たな化合物をデザインし合成する(豊岡)。4) 阻害薬-SR複合体の立体構造を明らかにして、作用機構の分子機構を明らかにする(水口)、のそれぞれの役割分担と達成目標のもとに研究班を組織した。

本年度は、1) ヒトSRのin vitroの酵素活性測定系を用いて、SR阻害薬候補のスクリーニングを進め、新規SR阻害薬候補をさらに見出した。また、化合物の阻害活性を定量的に解析するために、野生型SRを用いたin vitroの酵素活性測定系を確立した。さらにNMDA受容体の活性依存的な遺伝子発現をモニターできるArc-Luc Tgマウス(Izumi et al., 2011)を用いたin vivoの薬物効果評価に着手した(森)。2) マウスSRの遺伝子座にヒトSR cDNAを導入したヒト型SRを持つマウス系統を複製するための標的遺伝子組換えベクターを完成し、マウス胚性幹(ES)細胞に導入することにより、目的の相同組換えES細胞を取得した(井上)。3) SR阻害薬リード化合物から合成を進め、新規SR阻害薬の合成と活性評価を行った(豊岡)。4) 立体構造解析のためのSRタンパク質の大量発現と解析を進めた(水口)。

本研究班の薬剤開発の手法は、様々な酵素阻害薬の論理的デザインと検証のモデルケースとなると期待される。また、和漢薬から新たなSR阻害作用のある物質を見出す事も期待される。これら、一連の研究を連携推進し、新規薬物創製を進める手法を確立する事は、研究開発型の富山県の薬業振興に資する可能性も非常に大きいと考えられる。

【研究全体の背景と目的】

高齢化を迎えている現代社会では、痴呆、記憶障害、情動障害などの原因となる神経変性疾患に対する治療薬を開発する事が、社会保健の観点や高齢者の生活の質を保持する観点から、医学的、社会的に解決すべき重要な課題である。現在いくつかの神経変性疾患に対する治療薬が開発されつつあるが、いまだ十分とは言えない。例えば、現在、アルツハイマー病に対して日本の臨床現場で使われている薬物は、脳内アセチルコリンの濃度を高めるために、アセチルコリンの分解酵素であるエステラーゼを標的としたドネペジル、ガランタミン、リバスチグミンの3種類と、NMDA受容体を標的としたメマンチンの合計4種類であり、新たな分子標的に対する治療薬の開発は、神経変性疾患治療薬の新規開発の観点から、高齢化を迎える社会において非常に大きな市場ニーズがある。

脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病などでは、神経細胞死に伴う過剰なグルタミン酸の放出と、それに伴うNMDA受容体の過剰活性化、カルシウム流入、カルシウム依存的酵素群の恒常的活性化、ミトコンドリア膜電位の異常上昇などの一連の反応に伴う興奮毒性が、ネクローシスやアポ

トーシスによる神経変性疾患の進展に関わる共通機構と考えられている。

我々は、NMDA 受容体の作動を制御する内在性コアゴニストとしての D-セリンの役割に注目し、D-セリンの産生に関わるセリンラセマーゼ (SR) の遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作製し、その機能解析を進めて来た。その結果、SR が高次脳機能を担う前脳神経細胞に主に発現し、産生された D-セリンが NMDA 受容体の機能制御に関わる事を個体レベルで世界に先駆けて明らかにした (Inoue et al., 2008)。さらに、SR-KO マウスが、神経細胞死を引き起こす NMDA、あるいはアルツハイマー病の原因のひとつと考えられている A β ペプチドの脳内投与による興奮毒性に対して、抵抗性を示す事を明らかにした (Inoue et al., 2008)。また、他の研究グループの SR-KO マウスを用いた研究により、実験的脳梗塞による神経細胞死に対しても抵抗性を示す事も明らかにされている (Mustafa et al., 2010; Wolosker and Mori, 2012)。さらに、我々は、抑制性神経伝達を阻害するペンチレンテトラゾール (PTZ) 投与で誘発される全般性てんかん発作が、SR-KO マウスで軽減すること、PTZ 投与後の神経細胞の活性化状態を示す分子マーカーのひとつである c-Fos タンパク質の発現誘導が大脳皮質や海馬で減少していること、海馬歯状回で PTZ 誘発性の細胞外グルタミン酸濃度の上昇が生じないこと等を見出した (Harai et al., 2012)。従って、SR は、ヒトで生涯発症率が 0.5-1% と報告されているてんかん発作軽減のあらたな薬物標的となる可能性を示唆した。一方で、NMDA 受容体の機能を直接阻害する事は、記憶・学習などの高次脳機能の障害や、精神症状の発症に関わる可能性が示唆されているが、SR-KO マウスでは通常の記憶・学習行動に異常は見られず、精神症状様の異常行動も示さない (Mori and Inoue, 2011)。さらに最近 D-セリンは神経伝達物質が情報伝達を行うシナプスでの NMDA 受容体を選択的に活性化することで、神経細胞死を引き起こす事も脳スライス標本を用いた実験で報告されている (Papouin et al., 2012)。これらの事から、NMDA 受容体の機能修飾に関わっている SR から産生される D-セリンは、NMDA 受容体の過剰活性化状況においてより大きく関与している可能性が示唆される。

また我々は、SR が皮膚の角質細胞の最終分化過程で発現していることと、SR-KO マウスでは、皮膚のバリア機能に関わる遺伝子の発現が上昇している事を見出した (Inoue et al., 論文投稿中)。皮膚においても NMDA 受容体が発現している事が報告されていたが、本研究は、皮膚の NMDA 受容体の機能に SR 由来の D-セリンが重要である事を示唆するのみならず、本研究で開発される SR 阻害薬には、皮膚バリア機能の向上作用が期待される可能性を示唆している。

以上の背景から、SR の阻害薬は、神経系では神経変性疾患やてんかん発作の新たな治療薬となり、皮膚ではバリア機能の維持向上を促す薬物となりうると考えられる。

既に、申請代表者らは大腸菌に発現させたヒトの SR を用いて *in vitro* 酵素活性測定系を確立した。また、北里大学薬学部の広野修一教授のグループと共同し、ヒト SR の結晶立体構造情報 (Smith et al., 2010) を元に、*in silico* スクリーニングにより、400万種の化合物の中から阻害薬候補を 19種にま

で絞り込んだ。さらに、in vitro での酵素活性測定系により、この19種の化合物の中から従来報告されている阻害薬より活性の高い化合物を1種類、同程度の活性の化合物を3種類見出した。

従って、本研究では班員のそれぞれ専門分野での研究手法を活かし、1) ヒト SR に対する新たな阻害薬候補の詳細な活性測定を in vitro の系で行い、SR 阻害薬のリード化合物を決定する。また、本学の和漢医薬学総合研究所から共同研究として提供される和漢薬資源の中から SR に作用する薬物候補のスクリーニングを進める(森)。2) マウス SR をヒト SR に入れ替えたヒト型 SR を持つマウス系統を作製し、阻害薬の効果を in vivo で検証する(井上)。3) 阻害薬候補に化学的修飾を行い、特異性が高く、脳透過性を高めた新たな化合物をデザイン合成して評価する(豊岡)。4) 阻害薬-SR 複合体の立体構造を明らかにして、作用機構の分子機構を明らかにする(水口)、のそれぞれの役割分担をもつ研究班を組織した。

本研究の手法は、様々な酵素阻害薬の論理的デザインと検証のモデルケースとなると期待される。また、和漢薬から新たな SR 阻害作用のある物質を見出す事が期待される。これら、一連の研究を連携推進し、新規薬物創製を進める手法を確立する事は、研究開発型の富山県の薬業の振興に資する可能性も非常に大きいと考えられる。