

疾患とD-アミノ酸—バイオマーカーとしての可能性—

鈴木 将貴*・笹部 潤平・相磯 貞和

はじめに

アミノ酸 スーパーやドラッグストアで商品を眺めているとアミノ酸を含む製品がたくさんあることに気がつく。赤ちゃん用粉ミルク、スポーツ飲料、健康食品など身体の成長や健康を目的とした食品はもちろんのこと、化粧品やシャンプーなどの美容にも役立てられている。

アミノ酸は私たちの身体を形作る上で不可欠なピースである。私たちが手にする商品に書かれた「アミノ酸」のほとんどはタンパク質を構成する20種類のアミノ酸のことを指している。それらは主に肝臓で合成されているが、体内で合成が不十分な必須アミノ酸は、食事から補う必要がある。また、アミノ酸はタンパク質の原料以外にも機能がある。たとえばグルタミン酸は脳皮質の興奮性神経伝達物質として働き、グリシンは抑制性の神経伝達物質として働く。チロシンはドーパミン、トリプトファンはセロトニンの合成の原料となる。一方分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）は筋肉の発達を促し、スポーツ飲料に取り入れられている。さらにホルモンやビタミン、エネルギー合成の源としても利用され、身体の恒常性の維持のため機能している。

アミノ酸の体内動態は、摂取する食べ物により一時的な変動はあるが、局所での量は健常人では一定している。一方で、ある種の疾患により動態が大きく変動することが明らかになってきている。一般的に知られているのは肝臓の疾患である。肝臓は小腸が食物から吸収したアミノ酸を最初に代謝する組織であり、肝疾患患者の血液では分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）と芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、チロシン）の比率（Fisher比）が低下している。このFisher比は肝機能障害の診断として利用され、アミノ酸バランスが予後に大きく影響することを示した重要な例である。そして正常なFisher比を目標としたアミノ酸輸液が開発され、肝性脳症における代謝改善薬として治療上用いられている。また最近では、がんによって血清アミノ酸のバランスが崩れることが明らかとなり、がんの種類によって特徴的なアミノ酸の変動パターンをとることが判明した¹⁾。他にも代謝異常疾患の代表である糖尿病では発症前にアミノ酸代謝変化が認められ²⁾、早期診断に役立てられると期待されている。このように血中アミノ酸の変動をモニタリングすることでがんや生活習慣病の早期診断や進

行度の検査に役立つ可能性が見いだされ、いくつかの技術はすでに臨床的に応用されている。

L-体とD-体 さて、これまで述べてきたアミノ酸の概念は、正確にはアミノ酸の一側面である。

タンパク質構成アミノ酸のうちグリシンを除く19種類のアミノ酸にはキラル不斉炭素があり、L-体とD-体に分けることができる。生体の主要なタンパク質構成アミノ酸はL-アミノ酸であり、高等動物にはL-体のアミノ酸しか存在しないと考えられてきた。そのため、アミノ酸といえばL-アミノ酸が想像されてきた経緯がある。しかし、その後の革新的な分析技術開発によりキラル分子の微量分析が可能になり、D-体のアミノ酸が実は哺乳類の体内にも存在し、組織によってはL-体に引けを取らない量の量が検出されている。さらに一部のD-アミノ酸では生理機能が明らかにされ、疾患との関係性も見いだされている。そこで、本稿ではD-アミノ酸の生理機能と疾患との関わり、そしてバイオマーカーとしての今後の可能性について述べてい

D-アミノ酸の生理機能と疾患

D-セリンと統合失調症 D-セリンは中枢神経系、特に記憶学習などの高次機能を担う脳皮質、そして短期記憶や感情コントロールを担う海馬で豊富に存在することが確認されている³⁾。脳皮質や海馬には興奮性の神経伝達を担うグルタミン酸受容体の一つ、N-メチル-D-アスパラギン酸型グルタミン酸受容体（N-methyl-D-Aspartate receptor: NMDAR）が広範囲に発現しており、D-セリンはその調節因子として機能することが明らかにされた⁴⁾。D-セリンはNMDARのグリシン結合部位に結合⁵⁾してNMDARの活性を増強することで神経の活動頻度をコントロールし、結果として記憶の形成や情動反応に影響すると考えられている（図1）。

D-セリンとの関連性が注目された疾患が統合失調症である。統合失調症は妄想や幻覚といった陽性症状と、感情・思考・意欲の低下といった陰性症状を示し、他者とのコミュニケーションの障害により社会生活を送れなくなる深刻な疾患である。現在日本国内で推定80万人の患者がいると考えられており、およそ100人に1人が罹患する代表的な精神疾患である。主な原因は中脳辺縁系のドーパミン増加によるものと説明され、臨床で主に使用されている治療薬はドーパミン仮説に基づくものがほとんどである。しかしながら、現在でも難治性患者が

*著者紹介 慶應義塾大学医学部解剖学（特任助教） E-mail: Masataka.s@z8.keio.jp

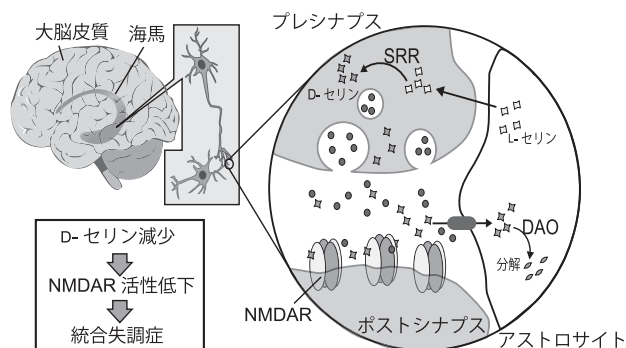


図1. D-セリンと統合失調症

一定の割合で存在し、既存の戦略とは異なる治療法が求められている。

統合失調症にはドーパミン説以外にも病態仮説がある。麻薬として1960年代のアメリカに広がったフェンサイクリジンという薬剤に、統合失調症様の症状を起こす作用があることが知られていた。このフェンサイクリジンにNMDARの阻害作用があることが明らかにされ、NMDARと統合失調症の関連性に注目が集まった。NMDARの機能を回復させることで統合失調症が改善するのではないかという仮説のもと、既存の治療薬とD-セリンを併用させたところ、既存の治療薬単独投与よりもさらに症状の改善がみられたこと⁶⁾、続いて統合失調症患者の血清中D-セリンが減少していること⁷⁾、患者髄液中のD/L-セリンの比率が減少していることが明らかにされた⁸⁾。さらに遺伝学的な見地からも、D-セリンの合成酵素であるセリンラセマーゼ (serine racemase: SRR) やD-セリンを分解する酵素D-アミノ酸酸化酵素 (D-amino acid oxidase: DAO)、およびDAOの活性化因子であるDAO activator遺伝子に統合失調症と関連する多型が見つかっている⁹⁻¹¹⁾。SRR欠損マウスでは組織学的な観察でも発達過程のシナプスおよび樹状突起の形態異常が認められ、異常行動と記憶障害が確認されている¹²⁻¹⁴⁾。これらの動物モデルを利用した、より詳細なD-セリンの機能と統合失調症発症メカニズムの解明に期待したい。

現在も統合失調症の診断は、問診により患者本人の自覚症状とその経過から判断するという古典的な診断方法であり、臨床的に用いられている生化学的検査方法が確立されていない。そのため主治医の経験値によって左右されやすく、また客観性に乏しいという問題を抱えている。統合失調症の診断にD-セリンを利用できるだろうか？血清中D-セリンが統合失調症で減少していることが確認されているが、その他の精神疾患との鑑別に利用できるのか、その病態特異性と正確性を確かめることが今後の課題になると考えられる。

D-セリンとALS D-セリンは運動機能にも必要である。ヒトは身体を動かす時、まず大脳皮質運動野の上

位ニューロンから脊髄へ神経シグナルを送り、脊髄の前方に位置する下位ニューロンへとシグナルを送る。興奮した下位ニューロンは支配筋へと電気信号を送り、筋肉を動かす。上位運動ニューロンは主にグルタミン酸神経であり、下位運動ニューロンに発現するグルタミン酸受容体を刺激して情報を伝達する。

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動神経が特異的に細胞死を起こす難病であり、患者は四肢の運動麻痺または嚥下機能が失われる球麻痺症状から始まり、3-5年以内に呼吸筋麻痺により死亡する。現在のところ有効な治療法はリルゾールのみであり、この治療薬の効果もわずかに生存期間を伸ばす程度に留まる。

D-セリンは統合失調症の項で述べた通りNMDARのコアゴニストとして機能しているが、下位運動ニューロンの樹状突起にNMDARが発現しており、グルタミン酸と同様D-セリンも運動神経の刺激伝導を調節すると考えられる。正常であれば適切な刺激により下位ニューロンが興奮するが、ALSでは、このグルタミン酸刺激が過剰になり、下位ニューロンに異常な興奮を誘導し、神経細胞死が引き起こされると考えられている。唯一の治療薬もグルタミン酸の放出を抑制することによりALSの進行を抑制する。

そのような中、筆者らはALSモデルマウスの病態解析と患者組織の解析により脊髄運動神経周囲のD-セリンの増加が運動神経細胞死の一因となることを明らかにした¹⁵⁾。ALSモデルマウスでは脊髄の運動神経路におけるDAOの活性低下を示し、症状の進行とともに脊髄中D-セリンの増加が確認される。加えてD-セリン分解活性のないDAO活性欠損 (DAO-/-) マウスではコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase: ChAT) 陽性の運動神経細胞の萎縮が観察され、その運動神経の支配筋の萎縮が認められる (図2)¹⁶⁾。

脊髄におけるD-セリンの蓄積は家族性ALSおよび孤発性ALS患者の組織においても観察されることから¹⁵⁾、広くALSの病態に関与している可能性がある。難病克服を目指してD-セリンを標的とした病態メカニズム解明と治療法の開発を続けたい。

ALSは現在のところ診断に有用なマーカーが存在しない。そのため多くは発症後の筋力低下や脱力感などの自覚症状により来院し、筋電図や反射を調べることでより明らかになる。自覚症状が出現した時にはすでに多くの神経細胞はダメージを受けており、進行を遅らせることで精一杯である。したがって早期診断のマーカーが得られれば、治療的介入を早めることができ、結果として寿命の延長が期待できると考えられている。

脊髄組織のD-セリンはALSで増加するが髄液に反映されるかは不明である。髄液は脊髄と脳を循環しているため、脳由来のD-セリンより少量の脊髄中D-セリンを捉えることは難しいかもしれない。しかしDAOの活性が低

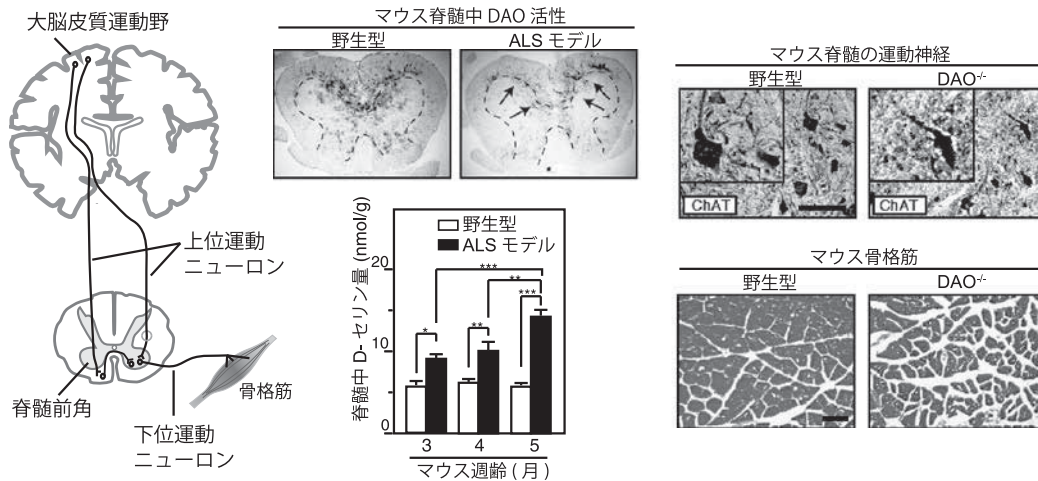


図2. D-セリンとALS. 運動神経路の概略図を示した(左). マウスの運動神経は脊髄の後根を通り, ALSモデルマウスでは運動神経周囲のDAO活性が低下し, D-セリンの減少が認められる(中央). DAO活性欠損マウスでは脊髄運動神経の変性と支配筋の萎縮が認められる(右). 文献16より一部改変.

下していることに着目すると, D-セリン以外のDAO基質となるD-プロリンやD-アラニンなどを調べることで診断に役立てられる可能性もあるのではないだろうか.

D-セリンと急性腎障害

腎障害は急性腎障害と慢性腎障害に分類される. 急性腎障害は早期の発見と対応により腎機能を維持・回復することができることから, 如何に早く診断できるかが患者の予後に影響する. 急性腎障害は腎前性, 腎性, 腎後性に分けられ, 腎性の40%が薬剤性または虚血性である. 現在臨床的に使用されている国際的なマーカーは尿流量と血清クレアチニンであるが, クレアチニンは急性腎障害が発症してから血清中濃度に反映されるまでにタイムラグがあり, 急性期の診断にはあまり有用ではない. そこで最近では, より早期の診断が可能な新たなバイオマーカーとして尿中NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) やKIM-1 (kidney injury molecule-1), 血清シスタチンCなどが臨床で用いられるようになっている. 一方で腎機能が60%以下になると慢性腎不全と診断され, 透析や腎移植の適応となる. 腎移植を行う患者のほとんどは両方の腎機能が失われた人だが, 腎臓を移植する際にドナーから貰い受ける正常な腎臓は一時的に血流を失うため虚血状態となる. この虚血時間が, レシピエントに移植された後の腎機能と患者の予後を左右することが分かっている.

腎臓は血液中の不要な成分を取り除き, 必要なものを再吸収する器官である. 血液を循環したL-アミノ酸は腎臓の糸球体で一度ろ過され, 尿細管のアミノ酸トランスポーターにより再吸収される. このトランスポーターのキラリ選択性は低い, 血液中に圧倒的に多く存在するL-アミノ酸が再吸収され, D-アミノ酸は再吸収されずにそのまま排泄されてしまうと考えられている. また,

再吸収された一部のD-アミノ酸も尿細管に発現しているDAOによって分解される. そのため濃縮された尿中にはたくさんのD-アミノ酸が検出され, 血清中のごく微量である.

我々の研究グループでは九州大学の浜瀬准教授および株式会社資生堂との共同研究で, D/L-アミノ酸分析技術を用いて, 虚血再灌流障害モデルマウスにおける血清中および尿中セリンを分析した(図3). このモデルマウスは腎移植後の虚血再灌流モデルとして一般的に利用されている. マウスより片側の腎臓を取り除き, 1週間後に残りの腎臓の栄養血管(腎動脈)を45分間クランプして血流を遮断した. その後再還流し, 再還流後の経過時間ごとに血清と尿を採取してそれぞれのD/L-セリン濃度を測定した. その結果L-セリンは再還流後4時間で急激に血中濃度が低下し, 尿中の濃度が増加した. 対照的にD-セリンは8時間後から血中濃度が増加し, 尿中のD-セリンは減少した. D-体とL-体の血中セリン濃度比(D/L)をとると, 再還流後4時間から時間経過とともに増加し, 尿中では逆にD/L比が低下することが確認された. これに対し, 尿中KIM-1の増加は一過性であり組織障害の進行度とは時間的に相関せず, 尿中NGALは超急性期で差が検出できなかった. このことから腎機能のモニタリングにはセリンのD/L比を比較することが, より病態に即したマーカーになると考えられる. また, 通常クレアチニンやシスタチンCなどのマーカーを用いる時は尿の濃さにより結果が左右されてしまうため, 患者は蓄尿をする必要がある. しかしD/L-セリンの比をとる場合は尿の濃度の影響を受けないため, 蓄尿を必要としないことが大きなメリットである. 我々のグループでは分析システムがセリンに特化しているものを利用したため, 他のアミノ酸の変動については未検討である. しかしアミノ酸のD/L全分析技術がすでに確立されつつある

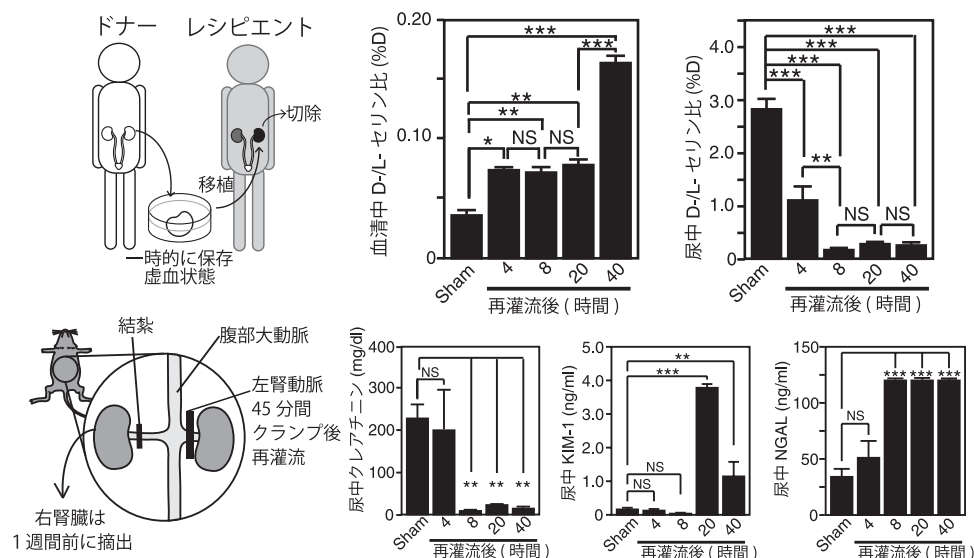


図3. 腎臓虚血再灌流モデルマウスの血中および尿中D/L-アミノ酸分析。腎移植における虚血再灌流障害と、モデルマウスの概略図を示した(左)。再灌流後は血清中D/L-セリンの比が上昇する一方、尿中の比率は低下する(上段)。同モデルマウスにおける各腎機能マーカーは、再灌流後4時間の超早期では変化が検出されなかった(下段)。文献17より一部改変。

ことから、それらのシステムを利用することでより感度の高いアミノ酸のマーカーが得られる可能性があり、今後の展開が期待できる。また、今回は虚血再灌流障害のモデルとして検討を行ったが、慢性腎障害も忘れてはならない。超高齢化社会を迎えた日本にとって腎機能障害は患者の健康のためにも、国民の医療費抑制のためにも予防すべき疾患である。慢性腎不全は不可逆的に緩徐に進行する疾患であり、薬剤、糖尿病、高血圧、痛風、感染症などさまざまな原因により引き起こされるため、定期的な腎機能のモニタリングは欠かせない。D/L-アミノ酸の分析技術は感度が高く、アミノ酸のろ過と再吸収のメカニズムに則した結果が得られるため、慢性腎不全の診断にも有益となると期待している。

最後に

D-アミノ酸研究とバイオマーカーとしての可能性

D-アミノ酸はもともと原核生物などの下等生物にしか存在しないと考えられてきた。そのためD-アミノ酸が哺乳類体内で発見されてからまだ25年と日が浅いが、数種類のD-アミノ酸は生理機能を持つことが明らかにされてきた。今回取り上げたD-セリン以外にもD-アスパラギン酸が精巣のテストステロン合成を促進することが明らかにされており、男性不妊症との関係性も興味深い。このように、これまで行ってこなかったアミノ酸のD/L-分離分析により、統合失調症やALSの病態生理が一部明らかとなり、さらにD/L-アミノ酸分析の腎機能モニタリングへの有用性を見いだしてきた。今後もまだ解明されていないD-アラニンやD-プロリンなどの生理機能と病態との関わりを追求することで、さらにD-アミ

ノ酸の分野が拡大できると考えている。

私たち医学・生物学の研究者は分析技術によって支えられている。分析技術の革新により日々新たな発見が得られる。そして研究者の発見を基にしてさらなる産業や製品が生まれ、私たちの生活が豊かになる。日本で発展してきたD-アミノ酸研究を日本人の手で広げていけるよう、我々も努力を続けたい。

文 献

- 1) Miyagi, Y. et al.: *PLoS One*, **6**, e24143 (2011).
- 2) Wang, T. J. et al.: *Nat. Med.*, **17**, 448 (2011).
- 3) Hashimoto, A. et al.: *FEBS Lett.*, **296**, 33 (1992).
- 4) Mothet, J. P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4926 (2000).
- 5) Wroblewski, J. T. et al.: *Neuropharmacology*, **28**, 447 (1989).
- 6) Tsai, G. et al.: *Biol. Psychiatry*, **44**, 1081 (1998).
- 7) Hashimoto, K. et al.: *Arch. Gen. Psychiatry*, **60**, 572 (2003).
- 8) Hashimoto, K. et al.: *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **29**, 767 (2005).
- 9) Chumakov, I. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13675 (2002).
- 10) Goltsov, A. Y. et al.: *Mol. Psychiatry*, **11**, 325 (2006).
- 11) Morita, Y. et al.: *Biol. Psychiatry*, **61**, 1200 (2007).
- 12) Basu, A. C. et al.: *Mol. Psychiatry*, **14**, 719 (2009).
- 13) DeVito, L. M. et al.: *Genes Brain Behav.*, **10**, 210 (2011).
- 14) Balu, D. T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E2400 (2013).
- 15) Sasabe, J. et al.: *EMBO J.*, **26**, 4149 (2007).
- 16) Sasabe, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 627 (2012).