

samples were used in this study after obtaining informed consent from the family of each patient. All patients were definitively diagnosed based on clinical and light microscopic findings and some of the data from several patients were previously reported elsewhere [1,5,13]. Spinal cords were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered solution (PBS) (pH 7.4) and embedded in paraffin. 5- $\mu$ m-thick transverse paraffin sections were prepared for immunohistochemistry, which was carried out using a guinea pig polyclonal anti-N-terminal domain of human p62 antibody (1:2000, GP62-N; Heidelberg, Germany) and a rabbit polyclonal anti-ubiquitin antibody (1:2000, DAKO, Denmark). For enhancement, autoclave treatment for 5 min was performed when anti-p62 antibody was used. Sections were blocked in normal horse serum for 30 min at room temperature, then labeled with the first antibody at 4 °C overnight, washed in PBS for 30 min, incubated with the second antibody provided by Histofine SAB-PO kit (Nichirei, Tokyo, Japan), washed in PBS for 30 min, and finally visualized by the avidin-biotin-peroxidase method. Observation was performed using an Olympus BX50 microscope.

For Bunina bodies, Hematoxylin-Eosin (H & E) staining was initially performed to observe where the Bunina bodies were present. After we took pictures of Bunina bodies, we tore the cover glasses out of the slides in xylene, decolorized

by alcohol, and then the same process concerning p62 immunostaining was followed.

### 3. Results

As previously reported [12], we confirmed that ubiquitin-positive inclusions in the granule cells of dentate gyrus of the hippocampus of ALS-D cases that were first reported by Okamoto et al. [13] were also p62-positive (data not shown).

P62-positive inclusions were observed in the anterior horn cells in 27 of 28 ALS cases, although the number of inclusions varied in each spinal cord section, ranging from a few to more than 20 per section. Since one ALS case showed marked loss of anterior horn cells due to severe degeneration, p62-positive inclusions might not be found in a few remaining anterior horn cells. The number of p62-positive inclusions in two cases showing the higher number of p62-positive inclusions was more than 10 in each section. The ubiquitin staining in their serial sections revealed that the proportion of p62-positive to ubiquitin-positive anterior horn cells was approximately 140% (23/16 and 16/11).

There were several different types of p62-positive patterns in this study. Firstly, waste thread-like immunoreactivities (Fig. 1A and C) were observed, which were also immunostained with anti-ubiquitin antibody (Fig. 1B and D)

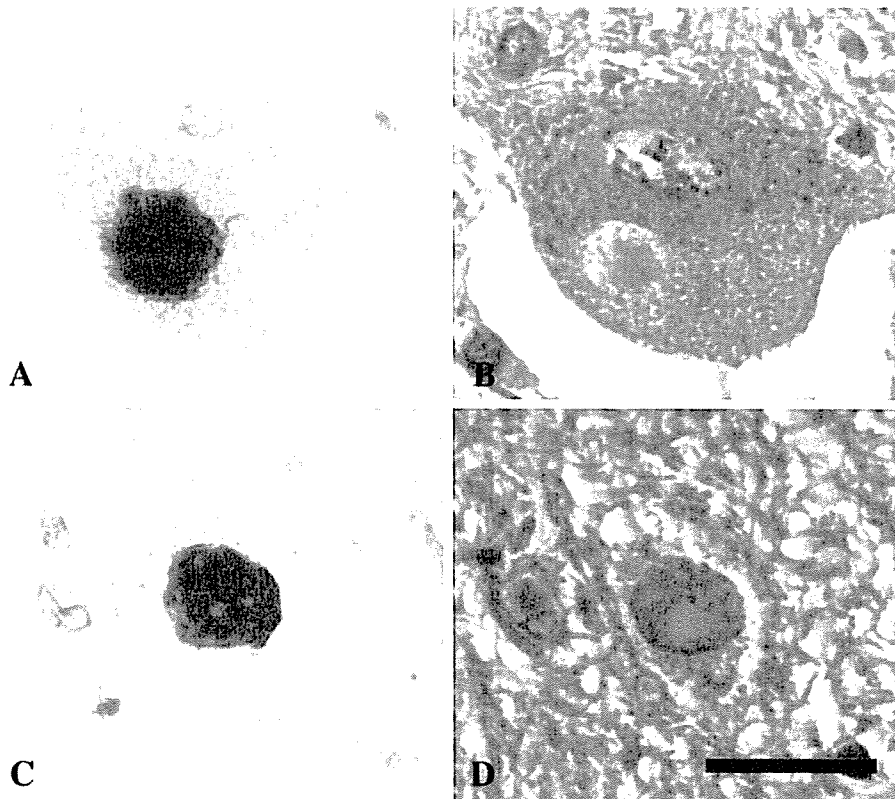


Fig. 2. p62 immunoreactivity for Lewy body-like inclusions and basophilic inclusions. A, C: Immunostaining for p62. B, D: H & E staining. Lewy body-like inclusions (A) and basophilic inclusions (C) were p62-positive, and the presence of these structures was confirmed with H & E staining on serial sections (B and D). Scale bar: 30  $\mu$ m.

in the serial sections, indicating that these corresponded to skein-like inclusions (SLI). Other waste thread-like patterns are shown in Fig. 1E and F. Secondly, Lewy body-like inclusions (LBLI) showing a round-shaped immunoreactivity with peripherally ambiguous staining (Fig. 2A), which we confirmed their presence with H & E staining as an eosinophilic core with an irregularly peripheral halo appearance (Fig. 2B) were also p62-positive. The core seemed homogeneously immunostained, while the halo was irregularly p62-positive (Fig. 2A and B). Thirdly, there were cauliflower-like immunoreactivities (Fig. 2C) in our previously reported ALS cases that contained basophilic inclusion (BI). H & E staining showed multilobulated globular inclusions surrounded by basophilic rims on serial section (Fig. 2D), indicating that BI was p62-positive. Fourthly, other different types of p62-positive reaction from those of SLI, LBLI, and BI were seen in the sections; small dot-like staining (Fig. 3A), homogeneous round staining (Fig. 3B) and round staining with peripherally stronger immunoreac-

tivity at the rim (Fig. 3C) with both being observed in the atrophic neurons, and staining in the processes (Fig. 3D).

Concerning the Bunina bodies, H & E staining was performed to confirm where those showing eosinophilic inclusions were located (Fig. 4A). Taking the pictures for Bunina bodies, immunohistochemistry of p62 was examined on the same section. The result showed that p62 immunoreactivities (Fig. 4B) were not seen at the same location as Bunina bodies (Fig. 4A and B), indicating that p62 was not co-localized with Bunina bodies and that Bunina bodies were not related to p62 protein. SLI and LBLI were observed as p62-positive on the same section (data not shown).

In our examination, anterior horn cells in 11 non-ALS cases were not positive for antibody to p62.

#### 4. Discussion

p62 can bind non-covalently to ubiquitin [14] and several signaling proteins leading to activation of NF- $\kappa$ B [15]. Since

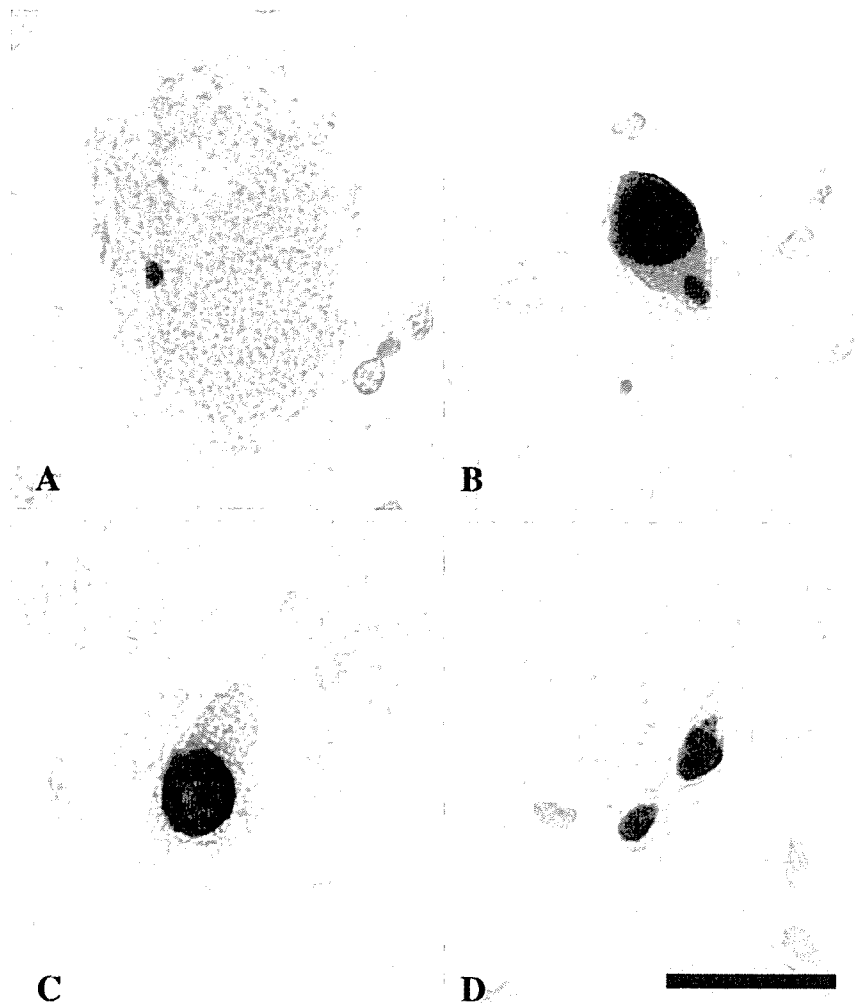


Fig. 3. Other p62 immunoreactivities. A: Small dot-like staining. B, C: Larger round staining. D: Staining in the vicinity of the node of Ranvier. Scale bar: 30  $\mu$ m.

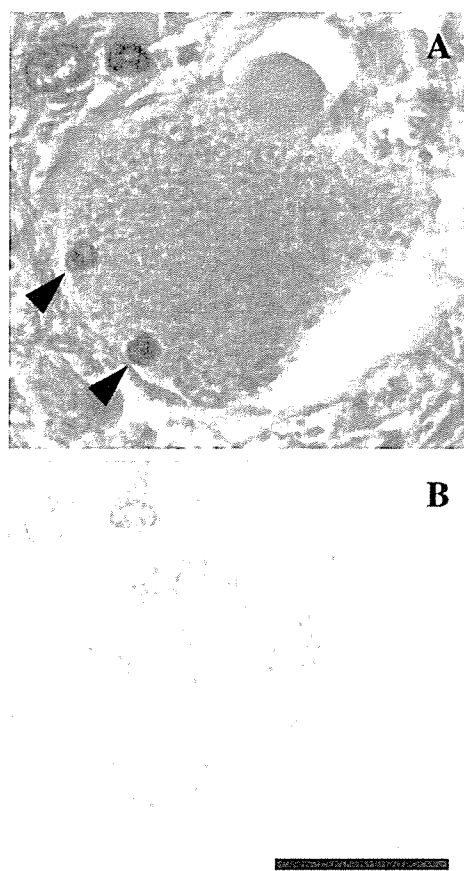


Fig. 4. p62-negative immunoreactivity for Bunina bodies. A: Immunostaining for H & E. B: Immunostaining for p62. Arrowheads indicate eosinophilic inclusions, implying that these correspond to Bunina bodies (A). On the same section, there was no p62-positive immunoreactivity in the same location as Bunina bodies (B). Scale bar: 30  $\mu$ m.

p62 immunoreactivities are observed in ubiquitin-containing intraneuronal or intragial inclusions in a number of human neurodegenerative diseases [11], the expression of p62 in the inclusions is associated with a dysfunction in the mechanism involved in the removal of excessive, misfolded, or defective proteins through the ubiquitin-proteasome pathway. Little attention has been paid to p62 expression in the spinal cord of ALS cases. Therefore, it was noteworthy to examine the characteristic inclusions in details.

It was very interesting that SLI, LBLI, and BI were p62-positive, because these inclusions have been reported to be ubiquitinated. Although p62 and ubiquitin were simultaneously expressed in these inclusions, the sequence of protein aggregation remains unclear. There is a report by Nakano et al. [12] that the proportion of p62-positive inclusions to the total number of ubiquitin-positive ones in the dentate gyrus of the patients with ALS-D is 27.5%. Contrarily, Kuusisto et al. [10] demonstrated the earlier accumulation of p62 than ubiquitin in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Moreover, hyaline bodies

in liver carcinoma contain p62, while ubiquitin immunoreactivities are weak or absent [16]. Mallory bodies seen in the hepatocytes in alcoholic steatohepatitis consist of p62, ubiquitin, and heat shock proteins such as HSP 70 and HSP 25 [8]. In our study, the number of p62-positive inclusions was apparently higher than that of ubiquitin-positive inclusions. We think that there are several possible interpretations; the antibody to p62 was more sensitive to that component of inclusions than the antibody to ubiquitin, the accumulation of p62 is earlier than ubiquitin, and the antibody to p62 recognizes additional unidentified proteins. We consider that p62 and ubiquitin may play a common role to prevent neuronal death in the ALS degenerative process. Even though re-expression or up-regulation of p62 and ubiquitin occurs in degenerative neurons, the cell death process is not highly variable because the induction of these proteins could not stop the degeneration, although the degenerative process might be delayed. In any case, re-expression or up-regulation of these proteins may be involved in the protective reaction against neuronal death.

For Bunina bodies, attempts at H & E and p62 stainings in the same section were conclusive. Taking into account that the Bunina bodies are not ubiquitin-positive, a negative reaction may be comprehensive. In case of small dot-like staining, a similar pattern could be seen when SLI shown in Fig. 1A was transversally cut. The round p62 immunoreactivity in atrophic neurons was inconclusive. When serial sections were stained with H & E to see if the special structure was present or not, there were no apparent detectable structures probably because the neurons were strongly atrophic. Although we found p62-positive immunostainings in the neuronal processes, the origin was unknown.

p62 probably plays a role associated with the ubiquitin proteasome system, because abnormal protein aggregates consist of both ubiquitin and p62. The primary mechanism for degradation of p62-ubiquitin-containing inclusions should be common not only to ALS cases but also other human degenerative diseases. Detailed examination of how the inclusions are formed, how the neurons survive by forming the inclusions, and what effects the inclusions have on the remaining neurons could contribute to clarifying the pathogenesis of ALS.

#### Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan to K. Okamoto.

#### References

- [1] Okamoto K, Hirai S, Amari M, Watanabe M, Sakurai A. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis immunostained with rabbit anti-cystatin C serum. *Neurosci Lett* 1993;162:125–8.
- [2] Leigh PN, Anderton BH, Dodson A, Gallo JM, Swash M, Power DM. Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. *Neurosci Lett* 1988;93:197–203.

- [3] Mizusawa H, Hirano A, Yen SHC. Anterior horn cell inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis contain ubiquitin and phosphorylated neurofilament epitopes. *Neuropathology* 1991;11:11–20.
- [4] Kato T, Katagiri T, Hirano A, Kawanami T, Sasaki H. Lewy body-like hyaline inclusions in sporadic motor neuron disease are ubiquitinated. *Acta Neuropathol (Berl)* 1989;77:391–6.
- [5] Fujita Y, Okamoto K, Sakurai A, Kusaka H, Aizawa H, Mihara B, et al. The Golgi apparatus is fragmented in spinal cord motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis with basophilic inclusions. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002;103:243–7.
- [6] Park I, Chung J, Walsh CT, Yun Y, Strominger JL, Shin J. Phosphotyrosine-independent binding of a 62-kDa protein to the src homology 2 (SH2) domain of p56lck and its regulation by phosphorylation of Ser-59 in the lck unique N-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:12338–42.
- [7] Janig E, Stumptner C, Fuchsichler A, Denk H, Zatloukal K. Interaction of stress proteins with misfolded keratins. *Eur J Cell Biol* 2005;84:329–39.
- [8] Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, et al. p62 is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol* 2002;160:255–63.
- [9] Kuusisto E, Suuronen T, Salmunen A. Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis and proteasomal inhibition in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:223–8.
- [10] Kuusisto E, Salmunen A, Alafuzoff I. Early accumulation of p62 in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: possible role in tangle formation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2002;28:228–37.
- [11] Kuusisto E, Salmunen A, Alafuzoff I. Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *NeuroReport* 2001;12:2085–90.
- [12] Nakano T, Nakaso K, Nakashima K, Ohama E. Expression of ubiquitin-binding protein p62 in ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis with dementia: analysis of five autopsy cases with broad clinicopathological spectrum. *Acta Neuropathol (Berl)* 2004;107:359–64.
- [13] Okamoto K, Hirai S, Yamazaki T, Sun XY, Nakazato Y. New ubiquitin-positive intraneuronal inclusions in the extra-motor cortices in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 1991;129:233–6.
- [14] Vadlamudi RK, Joung I, Strominger JL, Shin J. p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 1996;271:20235–7.
- [15] Ciechanover A. The ubiquitin proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994;79:13–21.
- [16] Stumptner C, Heid H, Fuchsichler A, Hauser H, Mischinger HJ, Zatloukal K, et al. Analysis of intracytoplasmic hyaline bodies in a hepatocellular carcinoma. Demonstration of p62 as major constituent. *Am J Pathol* 1999;154:1701–10.

# AMPA 受容体サブユニット GluR 2 の RNA 編集と ALS における神経細胞死

西本祥仁 日出山拓人 河原行郎 郭 伸

CLINICAL NEUROSCIENCE 別冊

Vol. 24 No. 2 2006 年 2 月 1 日発行

中外医学社

# AMPA受容体サブユニット GluR 2 の RNA編集と ALS における神経細胞死

西本 祥仁 日出山 拓人 河原 行郎 郭 伸

## 神経細胞死とグルタミン酸興奮仮説

哺乳類における中枢神経系のほとんどのニューロンは、速い神経伝達や可塑性に関してグルタミン酸を神経伝達物質にもつ。グルタミン酸受容体は  $\alpha$ -3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体を構成するサブユニットであり、4種のサブユニット GluR 1~GluR 4 がホモあるいはヘテロな4量体 heteromeric, homomeric tetramer を形成し、サブユニット構成の違いや、選択的スプライシング alternative splicing による flip 型/flop 型 variant をとることにより多様なチャンネル特性を現す。グルタミン酸受容体はイオンチャンネル型と代謝調節型に分類され、イオンチャンネル型受容体はさらに AMPA 受容体、カイニン酸(KA)受容体、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)受容体に分けられる。急性の神経細胞死には主として NMDA 受容体が関与するのに対し、慢性遅発性の細胞死には AMPA 受容体の関与が大きいことが明らかになってきている。特に脊髄運動ニューロンは、培養細胞系で長期にわたる AMPA 受容体アゴニストへの暴露により  $Ca^{2+}$ 流入を引き金とした選択的な細胞死をもたらすことから、AMPA 受容体の関与する神経細胞死に特に脆弱であることが示唆され、加えてラットを用いた in vivo での動物実験においても、AMPA 受容体アゴニストである KA 持続注によって遅発性発症、緩徐進行性の細胞死が認められることから<sup>1)</sup>、運動ニューロンを選択的に侵す遅発性発症の神経疾患、すなわち ALS との関連機序の解明が重要であると認識されるようになった。

## GluR 2 Q/R 部位と RNA 編集の生物学的意義

AMPA 受容体はホモあるいはヘテロなグルタミン酸受

にしもと よしのり 東京大学/大学院医学系研究科神経内科学  
慶應義塾大学/神経内科

ひでやま たくと 東京大学/大学院医学系研究科神経内科学  
かわはら ゆきお 同

The Wistar Institute, Philadelphia, PA  
かく しん 東京大学助教授/大学院医学系研究科神経内科学

容体サブユニットの4量体として形成される。これらのサブユニットの中で、神経細胞死の引き金となる  $Ca^{2+}$ 流入を規定する最も重要な役割を担うのは GluR 2 である<sup>2)</sup>。すなわち AMPA 受容体が GluR 2 をサブユニットにもつと  $Ca^{2+}$ 透過性は低く、GluR 2 以外の GluR 1, 3, 4 のみからなると  $Ca^{2+}$ 透過性は高くなる<sup>3)</sup>。この GluR 2 の特性は、第2膜領域のチャンネルポアに面する Q/R 部位の RNA 編集(後述)による(図1)。GluR 2 は他のサブユニット同様、遺伝子上においては(Q); CAG がコードされているが、pre-mRNA の段階で哺乳類のニューロンでは、ほぼ100% RNA 編集を受けて(R); CI(G)G として翻訳される。この Q/R 部位が編集されることが、GluR 2 の  $Ca^{2+}$ 透過性チャンネル特性の決定因子として重要である。したがって、未編集の GluR 2(Q) は他のサブユニット同様に、AMPA 受容体に組み込まれても  $Ca^{2+}$ 透過性は高い。

一般的に真核生物の細胞では、遺伝子から pre-mRNA が転写されると同時にプロセッシングも起こっている。その際に1塩基置換あるいは多塩基置換という形式で遺伝情報が書き換えられることがある。これを RNA 編集と呼ぶ<sup>4)</sup>。1塩基置換の RNA 編集には、シトシン(C)→ウラシル(U)、アデノシン(A)→イノシン(I)の2種類が知られており、前者は植物から哺乳類まで種を越えて保存されている。一方、後者は線虫、ショウジョウバエ、イカ、哺乳類においては中枢神経系で活発に行われていることが知られている。Exon 内の RNA 編集によって、翻訳時のアミノ酸が変わりタンパク質の構造あるいは機能変化を引き起こしたり(例: GluR 2)、コドンが終止コドンに変わることによって翻訳時のタンパク質が短くなり活性の変化を引き起こすことがある。そして後述のように特に GluR 2 Q/R 部位で RNA 編集が行われないと、その細胞の生死に直接的に影響を与えることから考えても、RNA 編集は生物学的に非常に重要な調節機構であるといえる。

GluR 2 Q/R 部位の RNA 編集が神経細胞の生存にとって重大な意味をもつことは、GluR 2 が Q/R 部位で RNA 編集されない変異マウスが、ホモ接合体・ヘテロ接合体い

ずれにおいてもけいれん重積に伴う神経細胞死により生後20日以内に死亡すること<sup>7)</sup>, およびQ/R部位をQと同様の意義をもつアスパラギン(N)に置換した人工的 mini-gene を遺伝子導入し, 編集型 GluR 2(R)が約76%に減少したモデルでは, 海馬 CA1領域の錐体細胞のCa<sup>2+</sup>透過性の増加を認めるが, 初期には目立った異常所見を呈さず, 生後12ヵ月に遅発性の運動ニューロン死を引き起こすこと<sup>8)</sup>より示されている. GluR 2の欠損と神経細胞死との関連は, in vivo ではGluR 2ノックアウトマウスが長期増強 long-term potentiation(LTP)亢進, 探索行動異常, 協調運動障害および海馬神経細胞の著明なCa<sup>2+</sup>透過性の増加などを認めるが, 神経細胞死を引き起こさないもの<sup>9)</sup>, in vitro ではGluR 2(R)を含まないAMPA受容体のみを発現する培養小脳Purkinje細胞が, Ca<sup>2+</sup>透過性の亢進とともに神経細胞死を引き起こすので一定ではない. この他, alternative splicing variants である flip 型, flop 型は異なる脱感作時間を持ち開口チャネル数を変えることで, また細胞表面のAMPA受容体密度は個々の受容体からのCa<sup>2+</sup>流入は変えないが, 全体としての細胞内Ca<sup>2+</sup>流入に影響を及ぼすことで, 細胞全体としてのCa<sup>2+</sup>流入を変える. しかし, これらは細胞死の直接原因とはならない. 以上の知見から, GluR 2の発現量の低下およびGluR 2の編集率低下が in vivo における神経細胞死の直接原因であることが推測されたが, 後者の及ぼす影響の方がはるかに大きい.

### 孤発性 ALS における GluR 2 RNA 編集

筋萎縮性側索硬化症 amyotrophic lateral sclerosis (ALS) は, 人口10万あたり発症率0.5~3人/年, 有病率2~8人程度の頻度で見られ, 90%以上は孤発性に発症する運動ニューロン疾患である. 発症後の病状は一切をもって不可逆的, 進行性に上位, 下位の運動ニューロンが障害を受け, 数年のうちに呼吸不全におちいる. 高齢発症, 球麻痺型においてはとりわけ予後が不良である. 終末期まで意識, 感覚を始めとする運動ニューロン以外の機能は保持されるために患者の苦痛は筆し難きものであり, 最も早急に治療開発が望まれている疾患の一つである. しかしながら, その独立概念の確立から140年間, 様々な原因仮説が謳われてきたが, いずれもその特徴的な病態を説明しうるものではなかった. そのような停滞した流れの中で, AMPA受容体を介しての興奮性神経細胞死をモデルとした遅発性運動ニューロン死についての重要な知見が得られてきた.

Kwakらは, AMPA受容体を介した神経細胞死のメカニズムがALS脊髄運動ニューロンで働いているかどうか

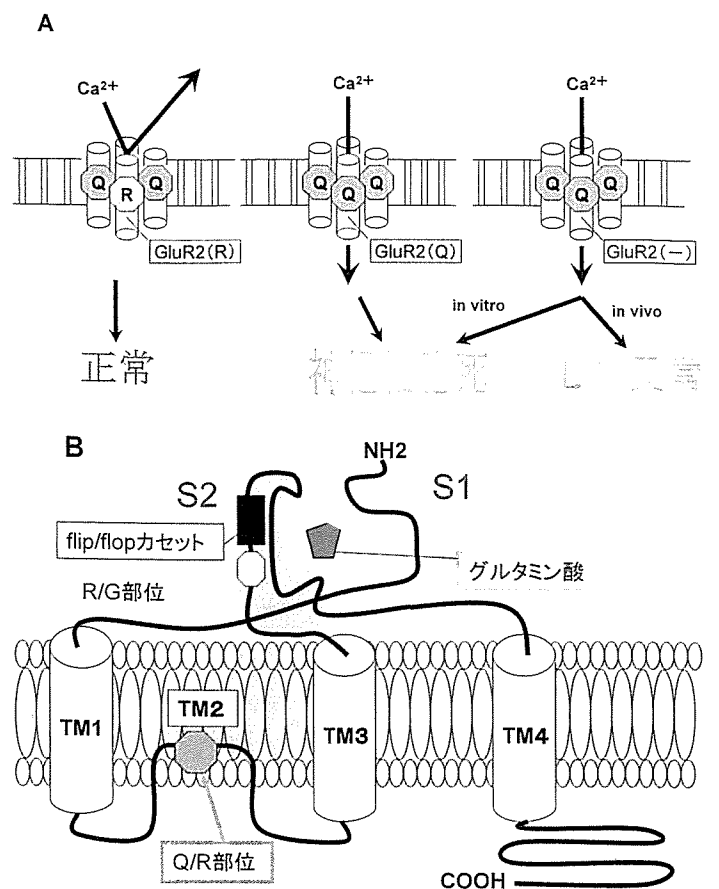


図1 AMPA受容体, グルタミン酸受容体サブユニットの構造 (西本ら<sup>3)</sup>, 日出山ら<sup>4)</sup>より改変)

A) AMPA受容体のCa<sup>2+</sup>透過性と細胞に与える影響. AMPA受容体はホモあるいはヘテロなグルタミン酸受容体サブユニットの4量体として形成される. AMPA受容体のCa<sup>2+</sup>透過性はQ/R部位がQのままであるかRに編集されているかによって決定する. 編集型GluR 2(R)を1つ以上含めば, Ca<sup>2+</sup>透過性は低くなり, 未編集型GluR 2(Q)あるいはGluR 2を含まないものでは, 高いCa<sup>2+</sup>透過性を示し様々な細胞機能の異常をきたす. ちなみに哺乳類の神経細胞では, ほぼ100%GluR 2は編集されGluR 2(R)として存在する.

B) GluRサブユニットの構造. Q/R部位は膜ドメインM2内に存在する. M3/M4間の細胞膜外にはやはりRNA編集を受けるR/G部位が存在する. S1, S2はグルタミン酸の結合部位.

TM; transmembrane domain, LTP; long-term potentiation.

を確定するために, GluR 2発現量の低下およびGluR 2のRNA編集率低下の有無を明らかにする目的で, laser beamを用いたmicro-dissection法により切り出した単一ニューロン組織での, AMPA受容体各サブユニットのmRNA定量およびGluR 2 Q/R部位RNA編集率の測定法を確立した. その結果, ALS脊髄運動ニューロンにおけ

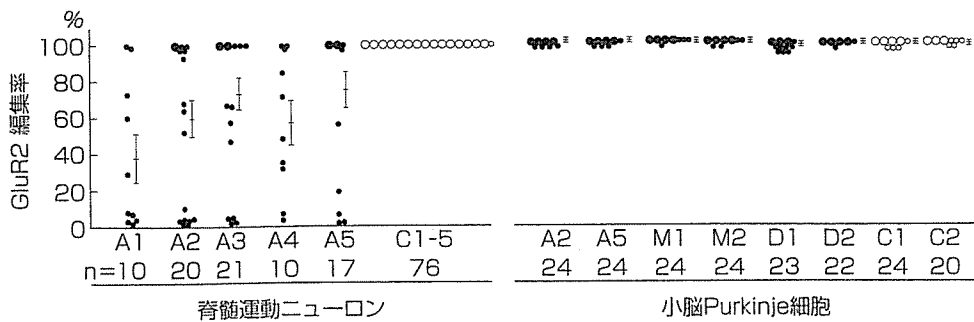


図2 孤発性ALSにおけるRNA編集率低下の疾患特異性・細胞選択性(Kawaharaら<sup>12)</sup>より改変)

各点(大点:5細胞, 小点:1細胞)は, ALS(A1-A5)群, 正常コントロール(C1-C5)群, 多系統萎縮症(M1, M2)群, 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(D1, D2)群における単一神経細胞(左:脊髄運動ニューロン, 右:小脳Purkinje細胞)のGluR2 Q/R部位の編集率を表す. 各群における平均値±標準偏差および1検体あたり解析した細胞数(n)も示す. 脊髄運動ニューロンでは正常コントロール群のすべての細胞でほぼ100%編集されているのに対し, ALS群の細胞では明らかに正常コントロール群に対して有意に低下しており(Mann-Whitney U-test,  $P < 0.001$ ), 1検体内でも細胞ごとに大きなばらつきを示していた. 小脳Purkinje細胞ではALS群, 多系統萎縮症群, 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症群と正常コントロール群との間で編集率に有意差はなかった(Mann-Whitney U-test,  $P > 0.05$ ).

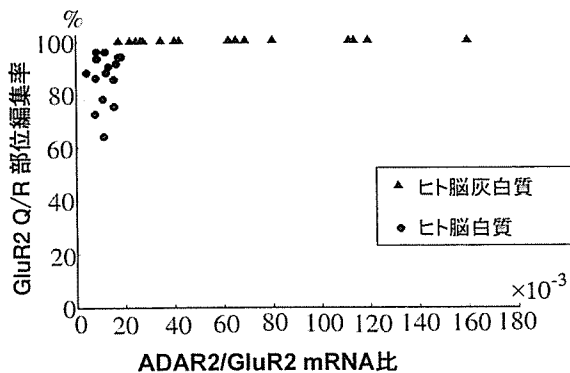


図3 GluR2 Q/R部位編集率とADAR2 mRNA発現量の関連性(Kawaharaら<sup>16)</sup>より改変)

GluR2 mRNAに対するADAR2 mRNAの発現比が $20 \times 10^{-3}$ 以下の時は, GluR2 Q/R部位の編集率は100%に至らない.  $20 \times 10^{-3}$ 以上になる時は, GluR2 Q/R部位は100%編集される. 正常白質組織においてはGluR2 Q/R部位のRNA編集率は64~99%であり, 白質のグリア細胞を発生母地とする悪性膠芽腫においても69~88%に留まることが知られている.

るGluR2 mRNAの発現量自体は低下していないこと<sup>10)</sup>, しかし脊髄前角組織レベルで疾患特異的・部位選択的にGluR2 Q/R部位RNA編集率が低下しており<sup>11)</sup>, その変化が前角組織内の運動ニューロン単位での特異的な変化に起因するものであることを報告した<sup>12)</sup>. すなわち, 正常対照群の脊髄運動ニューロン, ALS群および脊髄小脳変性症

の小脳Purkinje細胞では, GluR2 Q/R部位RNA編集率がほぼ100%に保たれているのに対し, ALS群脊髄運動ニューロンでは0~100%(平均値38~75%)と, その多くが100%に達していなかった(図2). さらに運動ニューロンが変性するSOD1遺伝子変異による家族性ALS(ALS1), 球脊髄型筋萎縮症spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)の変性した運動ニューロンにおいてもGluR2 Q/R部位のRNA編集は100%に保たれていることを明らかにした<sup>13)</sup>. この疾患特異性・細胞選択性の高い分子変化から, GluR2 Q/R部位のRNA編集異常が孤発性ALSの遅発性神経細胞死の病因解明の大きな手がかりの一つとなりうると考えた<sup>14)</sup>.

### ADAR2—その作用と発現制御

哺乳類におけるRNA編集を司る酵素としては, adenosine deaminase acting on RNA (ADAR)1~ADAR3の3種類が知られているが, ADAR3の基質に関しては現在まだ見つかっていない. いずれのtypeも, 2~3カ所のRNA結合部位と1カ所の触媒活性をもつ編集酵素部位を有している. GluR2 Q/R部位におけるRNA編集は, このうちADAR2によって行われている. ADAR2は核小体あるいは核内に存在しており, 編集部位を含むexonと下流のintron内にある不完全な相同配列exon complementary sequence (ECS)とによる, あるいはexon内のhairpin構造により形成される2本鎖RNAに対して編集作用をもつ. ADAR2のノックアウトマウスは, GluR2 ECS削除



により RNA 編集を阻害したマウスと同様の表現型を示し、さらに、この *ADAR2* ノックアウトマウスに編集型 *GluR 2* を発現する遺伝子導入を行うと表現型は正常化するため<sup>15)</sup>、*ADAR 2* の活性低下は *GluR 2* の編集異常を通じて神経細胞死を引き起こすと考えられる。

*ADAR 2* と *GluR 2* の RNA 編集との関連は、ヒト脳白質では *GluR 2* Q/R 部位の編集率は 100%ではなく低下しており、灰白質では 100%に保たれることに対応して、前者では *ADAR 2* mRNA(酵素)/*GluR 2* mRNA(基質)比が後者より低いことから予想される<sup>16)</sup>(図 3)。即ち *GluR 2* Q/R 部位の編集率は *ADAR 2* mRNA 発現量に依存し、ある閾値以上であれば、100%に編集率が飽和していると考えられる。したがって *GluR 2* の RNA 編集はもっぱら *in vivo* *ADAR 2* 活性に依存し、*ADAR 2* mRNA 発現レベルが *ADAR 2* 活性を規定する因子の一つとなっている可能性があげられる。

また *ADAR 2* は、alternative splicing から計算すると 48 通りの mRNA variants が存在する可能性があるが、実際の各 variant の存在比は均等ではなく大きな偏りがある

る<sup>17)</sup>。Variants の存在比の変化が *in vivo* *ADAR 2* 酵素活性を大きく左右している可能性があり、この酵素の調節制御機構の複雑さを予想させる。以上により、ALS 脊髄運動ニューロンにおける *GluR 2* Q/R 部位の RNA 編集低下の原因は、*ADAR 2* 活性が何らかの理由で低下したためと考えられる。

### 孤発性 ALS の治療への応用と今後の課題

疾患特異的・細胞選択的な遅発性神経細胞死が *GluR 2* Q/R 部位の RNA 編集低下に関与しているという切り口をつかみ、ようやく孤発性 ALS の原因解明への入り口が開かれた。上述したように *ADAR 2* の活性を規定する要因の一つに、基質に対する *ADAR 2* の mRNA 発現レベルの関与があると推測される。ただし *ADAR 2* 活性の調節には、複雑な *ADAR 2* mRNA プロセッシング機構をはじめ解明すべき課題は山積している。将来の展望としては、*ADAR 2* の活性修飾による治療法へと応用される日がくるかもしれない。医学は孤発性 ALS の特異的治療法の開発実現にむけて、今確かな足どりをもって進んでいる。

### 文 献

- 1) Kwak S, et al. An ALS rat model by AMPA receptor-mediated excitotoxicity. *Neurosci Res.* 2004 ; 50 : S 145.
- 2) Hollmann M, Hartley M, Heinemann S. Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science.* 1991 ; 252 : 851-3.
- 3) 西本祥仁, 日出山拓人, 河原行郎, 他. ALS における分子生物学的変化. *医学のあゆみ.* 2005 ; 215 : 3514-8.
- 4) 日出山拓人, 河原行郎, 郭 伸. ALS と AMPA 受容体. *脳と神経.* 2005 ; 57 : 585-98.
- 5) Burnashev N, Monyer H, Seeburg P, et al. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron.* 1992 ; 8 : 189-98.
- 6) 河原行郎, 郭 伸. 脳科学における RNA 編集の重要性. *Clin Neurosci.* 2004 ; 22 : 250-1.
- 7) Brusa R, Zimmermann F, Koh D, et al. Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient *GluR-B* allele in mice. *Science.* 1995 ; 270 : 1677-80.
- 8) Kumer R, Groom AJ, Bresink I, et al. Late-onset motoneuron disease caused by a functionally modified AMPA receptor subunit. *PNAS.* 2005 ; 102 : 5826-31.
- 9) Jia Z, Agopyan N, Miu P, et al. Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor *GluR 2*. *Neuron.* 1996 ; 17 : 945-56.
- 10) Kawahara Y, Kwak S, Sun H, et al. Human spinal motoneurons express low relative abundance of *GluR 2* mRNA : an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem.* 2003 ; 85 : 680-9.
- 11) Takuma H, Kwak S, Yoshizawa T, et al. Reduction of *GluR 2* RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1999 ; 46 : 806-15.
- 12) Kawahara Y, Ito K, Sun H, et al. Glutamate receptors : RNA editing and death of motor neurons. *Nature.* 2004 ; 427 : 801.
- 13) Kawahara Y, Sun H, Ito K, et al. Underediting of *GluR 2* mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS 1 or SBMA. *NSR.* 2006 ; 54 : 11-4.
- 14) Kwak S, Kawahara Y. Deficient RNA editing of *GluR 2* and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med.* 2005 ; 83 : 110-20.
- 15) Higuchi M, Maas S, Single F, et al. Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme *ADAR 2*. *Nature.* 2000 ; 406 : 78-81.
- 16) Kawahara Y, Ito K, Sun H, et al. Low editing efficiency of *GluR 2* mRNA is associated with a low relative abundance of *ADAR 2* mRNA in white matter of normal human brain. *Eur J Neurosci.* 2003 ; 18 : 23-33.
- 17) Kawahara Y, Ito K, Ito M, et al. Novel splice variants of human *ADAR 2* mRNA : skipping of the exon encoding the dsRNA-binding domains, and multiple C-terminal splice sites. *Gene.* 2005 ; 363 : 193-201.

特集 第41回 脳のシンポジウム

●運動ニューロン疾患をめぐる最近の進歩

# ALSの運動ニューロン死とグルタミン酸受容体の分子変化

郭 伸

神経研究の進歩

第50巻 第6号 別刷

2006年12月10日 発行

医学書院

## 特集 第41回脳のシンポジウム

運動ニューロン疾患をめぐる最近の進歩

### ALS の運動ニューロン死とグルタミン酸受容体の分子変化\*

郭 伸\*\*

運動ニューロンの神経細胞死には、AMPA 受容体を介したメカニズムが中心的な役割を果たしており、この神経細胞死には  $\text{Ca}^{2+}$  透過性 AMPA 受容体の割合が増加し、AMPA 受容体を介する  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が増大することが主要な役割を果たしている。AMPA 受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性亢進には、未編集型 GluR2 サブユニットを含む AMPA 受容体割合の増加の他に、編集型 GluR2 サブユニットを含まない AMPA 受容体割合の増加、のメカニズムがある。孤発性 ALS 運動ニューロンの神経細胞死には前者の分子変化が起こり、神経細胞死の一次原因となっているが、変異 *SOD1* に関連した家族性 ALS (ALS1) では後者のメカニズムが働き、変異 *SOD1* の細胞毒性を増強させていると考えられる。また、運動ニューロン死には、AMPA 受容体を介さない神経細胞死もあり、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) がその代表である。このように、運動ニューロン疾患により細胞死の分子機構が異なるので、治療法もそれぞれに特異的なものが求められる。孤発性 ALS における GluR2 の RNA 編集異常は、疾患特異性が高いので、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集を快復することが孤発性 ALS の特異治療につながると考えられる。GluR2 の RNA 編集は ADAR2 が触媒するので、孤発性 ALS 運動ニューロンではこの酵素活性が何らかの原因で部位特異的に低下したためと考えられ、ADAR2 活性を快復することが、GluR2 RNA 編集の正常化を通じて特異治療の標的になると期待される。

キーワード：amyotrophic lateral sclerosis, AMPA receptor, GluR2, neuronal death, RNA editing

#### はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病因研究は、一部の家族性 ALS で遺伝子異常が同定されたものの、なぜ運動ニューロンが死ぬのかというメカニズムは責任遺伝子の同定 (Rosen et al, 1993) より 13 年が経過した変異 copper-zinc superoxide dismutase (*SOD1*) 遺伝子関連家族性 ALS (ALS1) でも依然として解明されていない。一方、ALS の大多数を占める孤発性 ALS については、長年にわたる精力的な病因研究の中で、興奮性細胞死

が最も有力視されてき、運動ニューロン死には、イオンチャネル型グルタミン酸受容体サブタイプである AMPA 受容体を介した、 $\text{Ca}^{2+}$  の過剰な流入が引き金なる興奮性細胞死が主として関わることで、徐々に明らかになってきた (Kawahara & Kwak, 2005; Kwak & Kawahara, 2005)。筆者らは、孤発性 ALS の運動ニューロンには、AMPA 受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を亢進させる子変化の中でも、サブユニットの 1 つである GluR2 Q/R 部位に RNA 編集が起こらない未編集 GluR2 がえていることを明らかにした (Takuma et al, 1999

2006年8月29日受稿

\* Molecular mechanism underlying death of motor neurons in sporadic ALS: towards specific therapy.

\*\* 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学教室 (〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1): Shin Kwak  
Department of Neurology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113  
8655, Japan.

0001-8724/06/ ¥ 500/論文/JCLS

Kawahara et al, 2004)。この分子変化は、AMPA 受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を亢進させる要因の 1 つであり、神経細胞死の一次原因になるが、GluR2 を含まない AMPA 受容体もまた  $\text{Ca}^{2+}$  透過性が高い。単一運動ニューロンにおける筆者らの検討では、AMPA 受容体サブユニット GluR2 の発現量は ALS と正常対照とで有意差がないので (Kawahara et al, 2003b)、ALS の運動ニューロンで AMPA 受容体を介する神経細胞死を促進している分子異常は、もっぱら未編集 GluR2 の増加によるものと考えられる。未編集 GluR2 を含む AMPA 受容体、編集型 GluR2 を含まず GluR1, 3, 4 より形成される AMPA 受容体とも、正常のヒト中枢神経組織に発現しているが、その分布は異なり、前者は白質組織 (オリゴデンドログリア) には存在するがニューロンには存在せず、後者はアストロサイトや海馬の GABA 作動性介在ニューロンなど一部の神経細胞に存在し、少量ながら運動ニューロンにも発現している (Kwak & Weiss, 2006)。AMPA 受容体を介する神経細胞死の研究から、これらの分子変化により神経細胞死を引き起こすことが徐々に明らかになり、分子機構を基礎に置いた検討が必要になってきている。

本概説では、個々の運動ニューロン疾患の運動ニューロン死には上記を含め、どのような分子異常が関与しているのかについて、筆者らの得た知見を中心に概要を述べ、孤発性 ALS に生じている疾患特異的分子変化に基づいた、特異治療法開発のための戦略・問題点について概説したい。AMPA 受容体を介する神経細胞死のメカニズムや孤発性 ALS と GluR2 RNA 編集異常の関連に関しては、既報の概説を参照されたい (郭, 2004; Hideyama et al, 2005; Kawahara & Kwak, 2005; Kwak & Kawahara, 2005; 西本 et al, 2006)。

## I. 運動ニューロン疾患における神経細胞死の分子メカニズム

### 1. 変異 *SOD1* に関連した家族性 ALS (ALS1)

これまでの検討では、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は、脊髄小脳変性症・孤発性 ALS の小脳プルキンエ細胞、アルツハイマー病大脳皮質、ピック病側頭葉皮質、ハンチントン病線条体、脊髄小脳変性症 (Machado-Joseph 病・歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症・多系統萎縮症) の小脳 (Suzuki et al, 2003; Kawahara et al, 2004) など、様々な神経変性疾患の病的ニューロンや病変組織では正常ニューロン同様 100% に保たれていた。ただし、病的運動ニューロンにおける検討が欠けていたので、孤発性 ALS 以外の運動ニューロン疾患で同様の分子変化が生じていないことを示す必要があっ

た。特に、変異 *SOD1* に関連する家族性 ALS (ALS1) は、その動物モデル (ヒト変異 *SOD1* 導入動物) が ALS 全体の疾患モデルとして汎用されているので、病因の異同を明らかにするためにも RNA 編集異常の有無を検討する必要がある。

この目的のため、変異ヒト *SOD1* トランスジェニックラット (*SOD1*<sup>G93A</sup>Tg および *SOD1*<sup>H46R</sup>Tg) の発症個体および同腹の野生型同胞を用いて、運動ニューロンに発現している GluR2 mRNA Q/R 部位編集効率を定量した。その結果は、発症個体であっても検索した全ての運動ニューロン [*SOD1*<sup>G93A</sup>Tg 発症ラット (n=55) *SOD1*<sup>H46R</sup>Tg 発症ラット (n=62)] で、同腹の野生型同胞同様に、編集率は 100% に保たれていた。すなわち、変異 *SOD1* による運動ニューロン死には GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は関わっていないことが明らかになった (Kawahara et al, 2006)。

ALS1 では、AMPA 受容体を介する神経細胞死が関与していることを支持する知見が、モデル動物を用いた検討で示されている。すなわち、AMPA 受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を規定する GluR2 を欠損したマウスと、変異 *SOD1* トランスジェニックマウスの掛け合わせにより、興奮性アミノ酸であるカイニン酸に対する毒性が増加したこと (Van Damme et al, 2005)、GluR2 の過剰発現によりモデル動物の生存が延長したこと (Tateno et al, 2004) 等である。さらに、Q/R 部位をアスパラギン (N) に置換し、 $\text{Ca}^{2+}$  を透過する人工的 GluR2 (GluR-B (N)) を遺伝子導入したマウスと、変異 *SOD1* 遺伝子の double transgenic マウスでも神経細胞死が促進した (Kuner et al, 2005) ことから、ALS1 の神経細胞死にも AMPA 受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性亢進が関与していることが想定される。筆者らの検討では、ALS1 モデルラット運動ニューロンには GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常はみられないので、AMPA 受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を亢進させるメカニズムとして、GluR2 の RNA 編集異常以外の分子異常が起こっているはずである。

プロテオミクス検索により、変異 *SOD1*Tg マウスで AMPA 受容体サブユニットである GluR3 の発現が増加しているという報告があり、GluR3 mRNA の発現上昇が運動ニューロンでみられ、前角組織では GluR2 タンパクの発現が減少していることが報告されている (Spalloni et al, 2004; Tortarolo et al, 2006)。さらに、変異 *SOD1*Tg マウスに GluR3 に対するアンチセンス mRNA を投与すると、生存が延長することが報告されている (Rembach et al, 2004) [ただしこの論文では、GluR3 のタンパク減少は確認できていないので、実際

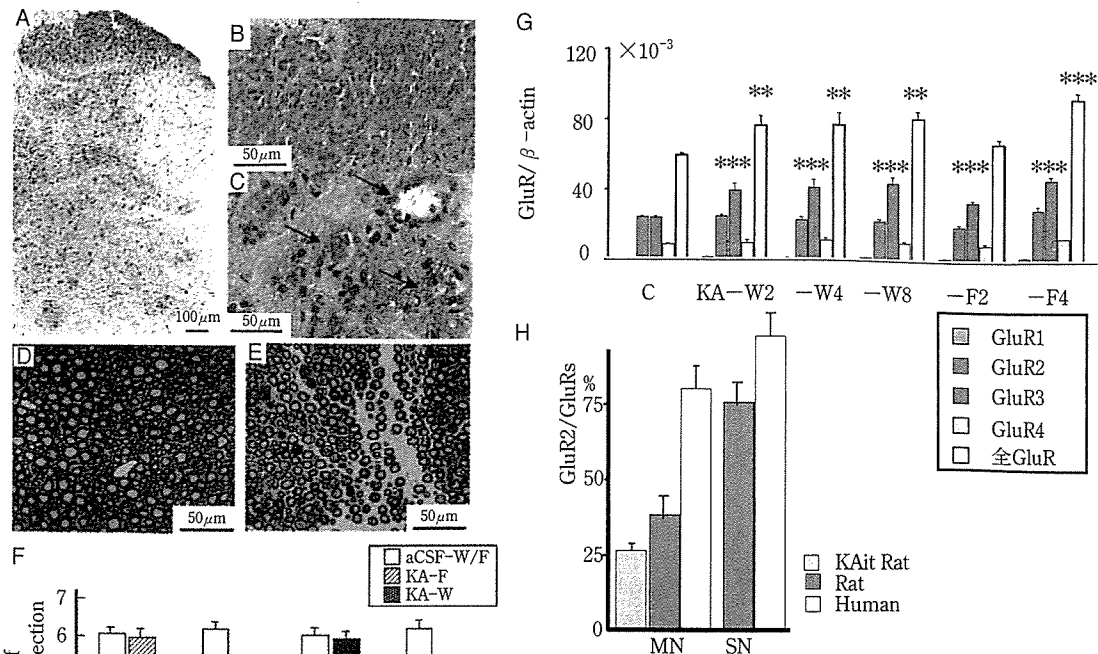


図1 カイニン酸髄注 ALS モデルラット

A: カイニン酸 3mM を 8 週間持続的に髄注した Wistar ラットの腰髄軸断像。B: A における後角の拡大図。細胞変性像のみられないことを示す。C: 同前角の拡大図。大径ニューロンにクロマチンの凝集、消失などの変性像およびグリア細胞の変性ニューロン辺縁への遊走を示す。D: 対照ラット腰髄前根断面。E: 上記ラットの腰髄前根断面。F: カイニン酸を 2, 4, 8 週持続髄注した Wistar (W) および Fischer (F) ラットの 大径前角ニューロン数。前者では 4~8 週の間、後者では 2~4 週の間で、細胞数の減少がみられる。G: カイニン酸髄注ラット有髄運動ニューロンにおける AMPA 受容体サブユニット mRNA の発現変化。GluR3 のみが上昇している。H: 正常ニューロンにおける GluR2 mRNA の、全 AMPA 受容体サブユニット mRNA に対する発現比率。ヒトでもラットでも運動ニューロン (MN) では脊髄後角ニューロン (SN) に比べ、GluR2 の発現比率が低い。カイニン酸髄注ラットではこの比率がさらに低下している。(文献 Sun et al, 2006 より、筆者改変)

に GluR3 のノックダウンによるメカニズムかどうかを明確に示してはいないという批判があるが、運動ニューロンにおけるタンパク発現の増減を、前角組織より定量的に検出することは感度の問題から不可能に近いので、運動ニューロンに選択的な GluR3 タンパクの発現上昇を定量的に捉えることは極めて困難である。後述するカイニン酸髄注ラットにおける運動ニューロンの GluR3 mRNA 発現上昇 (Sun et al, 2006) も、前角組織では検出できず、単一運動ニューロン組織を用いて初めて可能であった。GluR3 は Ca<sup>2+</sup>透過性のサブユニットなので、GluR3 の増加は AMPA 受容体サブユニットの中での GluR2 の相対的減少をもたらし、GluR2 を含まない Ca<sup>2+</sup>透過型 AMPA 受容体の割合を増やし、これにより運動ニューロン全体として

AMPA 受容体を介した Ca<sup>2+</sup>の流入を増加させ、細胞死につながると予想される。したがって、予想通り、既編集 GluR2 の増加ではなく、既編集 GluR2 により、GluR2 を含まない AMPA 受容体割合が増加したことが、細胞死の促進因子になっていると考えられる。運動ニューロンにおける GluR3 mRNA の発現増加は、筆者らが作製したカイニン酸髄注によるラット ALS モデルにおいてもみられた (Sun et al, 2006)。このラット ALS モデルは、カイニン酸を 4~8 週間、持続的に脊髄にも膜下腔に投与することにより作製するので、運動ニューロンに選択的な変性脱落が 4~8 週間の経過で緩徐に起こり、後角ニューロン、介在ニューロンには変性がみられない (図 1A-F)。症状変化としても運動麻痺のみで、感覚、膀胱直腸機能は保たれ

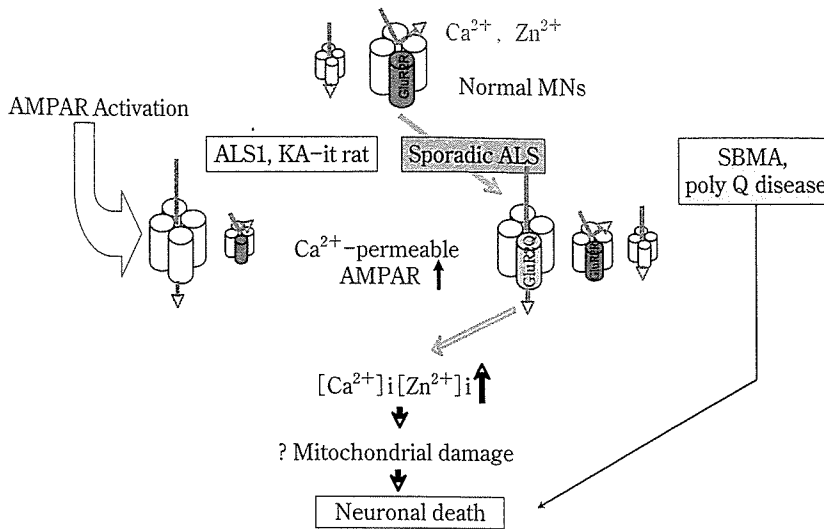


図2 運動ニューロン死の分子機構の種々：AMPA 受容体を介する神経細胞死を中心に正常の神経細胞ではほとんどのAMPA 受容体(AMPA)は編集型 GluR2 を含み Ca<sup>2+</sup>非透過性である。運動ニューロン(MN)などでは GluR2 を含まない Ca<sup>2+</sup>透過性のAMPA 受容体が、少数ながら存在していることが示されている。孤発性ALS、変異SOD1 関連家族性ALS(ALS1)のいずれにもAMPA 受容体を介する細胞死のメカニズムが働いている証拠があるが、両者の分子機構は異なり、ALS1ではGluR2の割合の減少により編集型GluR2を含まないAMPA受容体の割合が増えることにより(左)、孤発性ALSでは未編集型GluR2を含むAMPA受容体が増えることにより(中)、Ca<sup>2+</sup>透過性のAMPA受容体が増加し、細胞内Ca<sup>2+</sup>(Zn<sup>2+</sup>)濃度が上昇することが神経細胞死を引き起こす。ただし、後者が単独で神経細胞死を引き起こすのに対し、前者には変異SOD1の細胞毒性などの因子がさらに加わる必要がある。これに対して、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)の運動ニューロン死には、AMPA受容体を介するメカニズムは働いていない。

いる。興味深いことに、運動ニューロンのみでGluR3 mRNAの発現上昇が、少なくとも2週目以降にみられる(図1G)。GluR3以外のAMPA受容体サブユニットには発現量の変化がみられない。さらにこの分子変化はAMPA受容体のアンタゴニストにより阻止される。GluR2 Q/R部位のRNA編集異常はみられない。以上のことから、このモデルラット運動ニューロンの神経細胞死には、AMPA受容体のCa<sup>2+</sup>透過性亢進が関わっているものの、その分子メカニズムは、孤発性ALSとは異なり、GluR3が増加したためにGluR2のAMPA受容体サブユニットに占める割合が減少(対照40%に対しモデルラットでは29%)し、GluR2を含まないCa<sup>2+</sup>透過性のAMPA受容体が運動ニューロンで増加するためと考えられる(図1H)。もともと脊髄運動ニューロンにおけるGluR2 mRNAの発現は、他の神経群に比べ低いので(図1H)、GluR3の発現増加によるGluR2割合の減少は運動ニューロンでは比較的大きなものになる。この分子異常はALS1モデルマウスにみられる

ものと同等であり、ALS1では、AMPA受容体を介した細胞死のメカニズムが働いており、SOD1の細胞毒性を促進する因子になっていると考えられる。さらに、AMPA受容体アンタゴニストにより抑制されることから、AMPA受容体を持続的に刺激することがGluR3 mRNAの高発現につながることを予想され、ALS1では、グルタミン酸システムが過剰に機能している可能性がある。

このように、AMPA受容体を介する細胞死には、少なくとも2種類の分子メカニズムが独立に働いていると考えられる(図2)。1つはQ/R部位未編集型GluR2の増加であり、他方は編集型GluR2の相対的減少であり、いずれもAMPA受容体のCa<sup>2+</sup>透過性を増すことで細胞死を引き起こす(Kwak & Weiss, 2006)。ただし、GluR2のノックアウトマウスでは、神経細胞死が起こらないとされているので(Jia et al, 1996)、編集型GluR2の減少による神経細胞死には、AMPA受容体の過剰な興奮や、変異SOD1による細胞死カスケー

ドの開扉など、神経細胞生存に不利な条件がさらに加わることが必須のようである。これに対し、未編集型 GluR2 増加による神経細胞死の場合には、変異マウスによる検討からも (Brusa et al, 1995), この分子異常のみで神経細胞死を引き起こすに足りると考えられる。

## 2. 球脊髄性筋萎縮症 (spinal and bulbar muscular atrophy: SBMA)

SBMA は、X 染色体遺伝形式をとる運動ニューロン疾患であり、他方では、複数の変性性神経疾患の原因として明らかにされた、ポリグルタミン鎖伸長に伴う神経変性疾患であるという点からも、孤発性 ALS の神経細胞死のメカニズムとの異同を検討することは、神経変性疾患における神経細胞死のメカニズムを解明する上で大きな意義がある。特に、ポリグルタミン鎖伸長に伴う神経変性疾患のいずれもが長い臨床経過をたどるのに対し、孤発性 ALS は進行が速い点で、臨床的観察からも神経細胞死のメカニズムが共通であるとは考えにくく、運動ニューロン死の多様性の理解にもつながり、神経細胞死の機構全般への神経科学者全般の理解を高めるものと考えられる。

筆者らは、SBMA3 症例 (死亡時年齢 60~78 歳, アンドロゲン受容体遺伝子 CAG リピート数 42~48) の凍結脊髄から、100 個以上の運動ニューロンを切り出した。そのうち、計 44 個 (各例 12~16 個) で GluR2 mRNA に由来する PCR 産物が得られ、その全てで Q/R 部位は 100% 編集されていた (Kawahara et al, 2006)。SBMA の残存運動ニューロンは極めて少なく、採取した細胞でも GluR2 に対する RT-PCR が可能であったものは、そのうち 3 割前後であった。検索できた運動ニューロンは比較的変性過程が早期であることが予想されるものの、疾患の進行が緩徐であることを考えると、変性に至る過程が緩徐で、残存ニューロンでも変性過程を完全に免れているとは考えにくい。本研究で GluR2 mRNA Q/R 部位の編集率が、検索した SBMA 運動ニューロン全数で 100% に保たれていることが明らかになり、SBMA では RNA 編集異常が細胞死に関与している可能性は極めて低いといえる。以前報告した、歯状核ルイ体淡蒼球萎縮症ブルキンエ細胞における GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が保たれていたこと (Kawahara et al, 2004) と考え合わせると、ポリグルタミン鎖伸長に伴う神経変性疾患の細胞死は、GluR2 RNA 編集異常によるものではないといえ、神経細胞死の過程が極めて緩徐であることと相まって、孤発性 ALS のものとは異なるメカニズムによることを示唆する。

ポリグルタミン鎖伸長に伴う神経変性疾患に興奮性

細胞死が関与しているかどうかに関する知見は、主にハンチントン病の疾患モデルにより得られており、AMPA 受容体感受性は野生型と変わらないか (Levine et al, 1999; Zeron et al, 2002; Snider et al, 2003; Zeron et al, 2004), むしろ低い (Morton & Leavens, 2000) という。したがって、ポリグルタミン鎖伸長に伴う神経変性疾患の神経細胞死には、AMPA 受容体を介するメカニズムが関与しているとは考えにくい (図 2)。

## 3. 運動ニューロン疾患の神経細胞死

以上に述べたように、運動ニューロン疾患における神経細胞死のメカニズムは多様であり、しかも AMPA 受容体を介するメカニズムにも少なくとも 2 種類存在し、孤発性 ALS と ALS1 における分子メカニズムは異なる。このことは、ALS の治療薬開発においては、SOD1g モデルを用いる場合注意を要することを示唆している。

ALS は臨床像が多彩であり、孤発性 ALS といえども、単一疾患なのか、症候群であるとしたらどこまでを疾患単位と捉えるべきなのかについても議論の分かれるところである。ALS1 との間に、神経細胞死につながる分子変化に大きな違いが見出されたことから、孤発性 ALS の様々な表現型における分子変化の異同を調べることにより、疾患単位を捉え直すことが可能かもしれない。この観点から、運動ニューロンにおける未編集 GluR2 mRNA の増加は、経過 10 年以上の臨床的な SPMA、抗塩基性封入体が出現する若年発症 (Aizawa et al, 2000) などでも認められ、臨床像の異なるこれらの ALS でも共通の分子異常が発症のメカニズムになっていることが想定される。

## II. GluR2 の RNA 編集異常を引き起こす分子メカニズム

GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は、神経細胞の生存にとって必須であり、胎生期より 100% に保たれているこの部位の RNA 編集が起らない変異マウスは、いれん重積のため生後 20 日で死亡してしまう (Bru et al, 1995)。この分子異常により運動ニューロンに性が生じるかどうかを直接明らかにした報告はなが、GluR2 の Q/R 部位をアスパラギン (N) に置換し GluR2 をコードする mini-gene GluR-B (N) を遺伝導入した変異マウスは、1 年を経過して運動機能障と脊髄前角細胞数の減少を引き起こす (Feldmeyer et al, 1999; Kuner et al, 2005)。この 1 アミノ酸置換は、編集 GluR2 の増加と同じチャンネル特性を AMPA 受容体にもたすので、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常が特に運動ニューロンを好んで障害することを示し

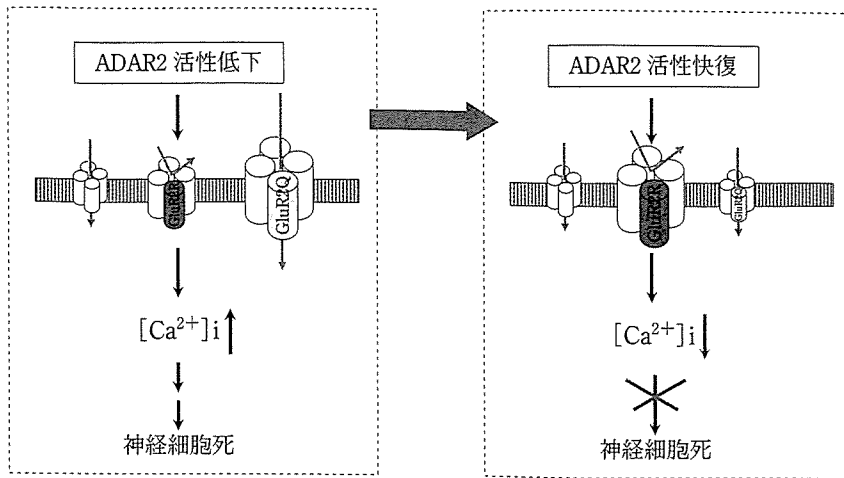


図3 孤発性 ALS (筋萎縮性側索硬化症) の治療戦略

孤発性 ALS では、ADAR2 活性の低下により、未編集型 GluR2 を含む AMPA 受容体割合が増え、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇に引き続く細胞死のカスケードが開扉すると考えられるので、ADAR2 活性を運動ニューロンで快復することができれば、編集型 GluR2 を増やすことにより運動ニューロン死を阻止でき、孤発性 ALS の治療が可能になると考えられる。

いる。

GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は、RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2) と呼ばれる 2 本鎖 RNA に作用する酵素によって触媒されることが齧歯類で示され、ADAR2 のノックアウトマウスは、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が起らないために、前述の変異マウス同様、けいれん重積により生後 20 日で死亡してしまう (Higuchi et al, 2000)。また、最近の報告で、一過性脳虚血後に遅発性細胞死を起こす海馬 CA1 錐体細胞では ADAR2 mRNA の発現量が低下し、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常が起こっていること、また、この細胞死は ADAR2 の遺伝子導入により回避できることが示され (Peng et al, 2006)、ADAR2 活性低下が GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常および神経細胞死の原因になることが明らかにされた。この報告では、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は細胞ごとに異なり、0%~100%まで広く分布しており、筆者らが ALS 運動ニューロンで明らかにした編集率分布と極めてよく似ている点が興味深い。従来、脳虚血後の遅発性神経細胞死には GluR2 mRNA の発現量が落ちるためであるとする説が強かったが (Pellegrini-Giampietro et al, 1997; Kwak & Weiss, 2006)、同じ AMPA 受容体を介するメカニズムであっても、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常による細胞死であることが明らかになった。したがって、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は、(1) 神経細胞死の原因であるこ

と、(2) 少なくとも運動ニューロンや海馬 CA1 錐体細胞に選択的な脱落変性を引き起こすこと、(3) その神経細胞死は遅発性の緩徐進行性であること、(4) ADAR2 活性の低下によりもたらされるものであること、が結論できる。

齧歯類脳のみならずヒト脳でも、ADAR2 mRNA は灰白質を中心に発現しており、ADAR2 mRNA 発現量の低い白質では GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は必ずしも 100% に保たれていない。詳細に検討すると、ADAR2 mRNA の対 GluR2 mRNA 比での発現量がある閾値より低くなると、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率が 100% を割ることが明らかになり、白質では正常脳でも 60% 台のものもある (Kawahara et al, 2003a)。このことは、ヒト脳でも GluR2 Q/R 部位の RNA 編集を触媒するのは ADAR2 であり、ADAR2 mRNA の発現量が編集率を規定している要因の 1 つであることを示している (Kawahara et al, 2003a; Kwak & Kawahara, 2005)。

以上のことから、ALS の運動ニューロンでは ADAR2 活性が低下して RNA 編集異常が起こっている可能性が高いので、ALS 前角組織で検討してみると、ADAR2 mRNA 発現レベルは基質である GluR2 mRNA の発現量比でみる限り有意に低下しており (Kawahara and Kwak, 2005)、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率と ADAR2/GluR2 比との間に相関がみられる。前述したように、ADAR2 mRNA 発現量は ADAR2 活性



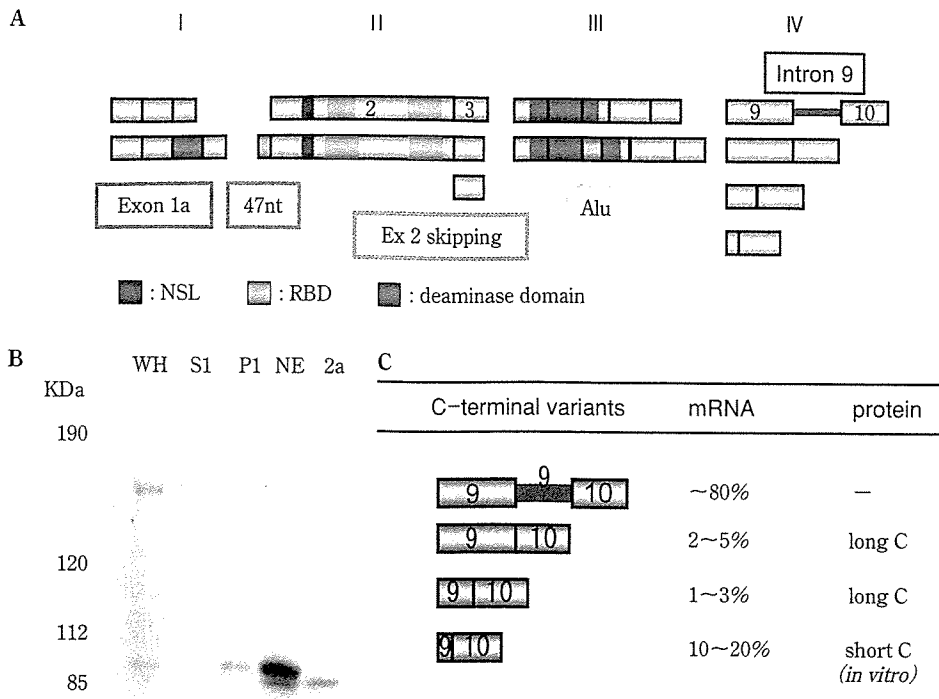


図 4 ヒト脳の adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2)

A : ADAR mRNA ヴァリアント。第 I ドメインには 2 種類 (exon 1a を含むものと含まないもの) 第 II ドメインには 3 種類 (47 ヌクレオチドカセットを含むものと含まないもの、および exon 2 skipping)、第 III ドメインには 2 種類 (Alu 配列を含むものと含まないもの)、第 IV ドメインには 4 種類 (intron 9 retention、全長 exon 9、短縮型 exon 9 二種) のヴァリアントが存在する。これらは独立にスプライシングを受けるので、理論的には  $2 \times 3 \times 2 \times 4 = 48$  種類の mRNA ヴァリアントが存在することになる。B : ヒト小脳分画に対するイムノプロット。抗 ADAR2 抗体が認識するバンドは 2 本あり、核分画に局在する。この 2 本は、第 III ドメインに Alu 配列が含まれるかどうかでサイズが決まり、ドメイン I、II の最上段、第 IV ドメインの第 2、3 段に示したヴァリアントから形成される 4 種の mRNA のみから翻訳されると考えられる。WH : whole homogenate, S1 : first supernatant, P1 : first pellet, NE : nuclear extract, 2a : recombinant ADAR2a。C : 第 IV ドメインのヴァリアントのヒト小脳における発現比率。イントロン 9 retention タイプの発現量が最も多いが、このヴァリアントを持つ mRNA はタンパクに翻訳されない。次に多いのは、短縮型 exon 9 を持つ mRNA であるが、これもタンパクに翻訳されない。したがって、全 mRNA のうち、翻訳されうる第 IV ドメインを持つ mRNA は全体の 3~8% にすぎない。さらに、第 II ドメインで、exon 2 skipping タイプは活性型タンパクにはなり得ないにもかかわらず、第 II ドメインの 20% を占めるので、活性型タンパクに翻訳される mRNA は 2~6% 程度と考えられる。(文献 Kawahara et al, 2005 より、筆者改変)

を規定する因子の 1 つであり、ALS 運動ニューロンにおける GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は、ADAR2 活性の低下によると考えられる。

このような検討から、既編集 GluR2 割合を運動ニューロンで増やすことが、孤発性 ALS の特異治療につながると考えられる。そのための戦略として、RNA 編集酵素である ADAR2 活性を快復することが 1 つの可能性であり (図 3)、他方、ADAR2 活性の調節機構

をより詳細に検討して、真の病因を解明することがより特異的治療法の開発につながる。

ADAR2 活性調節機構については、未解明の部分が多い。筆者らの検討では、ADAR2 mRNA には、48 種にもなる ADAR2 mRNA スプライスヴァリアントが存在する (Kawahara et al, 2005) (図 4A)。ヒトの小脳組織の検討では、ADAR2 タンパクとして同定できるのは 2 種のみであり (Kawahara et al, 2005) (図 4B)、い

ずれも *in vitro* での活性を持つ (Gerber et al, 1997; Liu et al, 1997)。これらの活性タンパクをコードする mRNA ヴァリエントは 48 種中 4 種に過ぎず、しかもその発現量は、ADAR2 総 mRNA の 5%前後である。総 mRNA 発現量の 80%以上を占めるのは、イントロン 9 retention のあるヴァリエントであり、タンパクに翻訳されない (Kawahara et al, 2005) (図 4C)。このような mRNA が大量に存在する理由として、スプライシング速度が遅い、nonsense-mediated decay (NMD) が働かないなどの他にも、生理的なストレスにより大量のタンパクが必要になったときのためのストックである、とする生物学的な意味付けをする考え方もある (Prasanth et al, 2005)。この考え方が正しければ、大量に存在する翻訳されないヴァリエントは、いざ鎌倉のための貯蔵品であり、細胞環境の変化に伴い翻訳型のヴァリエントを直ちに産生するためのものであると考えられる。この場合、生理的には翻訳型ヴァリエントの割合は極めて小さいので、わずかにスプライシング効率を上げるだけで効果的に RNA 編集を調節できる。ALS 運動ニューロンではこの調節機構に微妙な変調を来し、活性型ヴァリエントの産生が落ちて調節機構が働かない可能性がある。

#### 擱筆を前に

疾患として世に出て以来 140 年が経過しようとしている時点で、ALS の病因が解明され始め、疾患分類、診断についても疾患を引き起こす分子メカニズムから行われる時代によく近づいてきた。孤発性 ALS についても、病因の糸口が捉えられたことにより、疾患特異的な分子機構についての研究から特異治療への道もみえてきた時代である。多くの神経変性疾患は、孤発例が大多数を占めるが、家族例の研究により病態の理解は飛躍的に進んだ。しかし、ALS の場合には、ALS1 を代表とする家族性 ALS の研究からは運動ニューロンはなぜ死ぬかの理解は必ずしも深まらず、むしろ、グルタミン酸を中心とした興奮性細胞死のメカニズムの神経薬理・生理・生化学研究の中からの掘り下げの方がわれわれ神経内科医の理解を深めた感がある。この研究の流れが、脳内活性物質としてのグルタミン酸システムの異常が神経疾患の細胞死に働いているという認識を深め、機能からの治療法開発戦略につながっている。この分子異常の解明に向けた研究が、実際の治療への反応に結びつくまでの時間は、Charcot 以来経過した時間を考えると、はるかに短くて済むという予感がする。

#### 謝辞

この研究は、文部科学省科学研究費特定領域研究、厚生労働科学研究費、ALS 協会、三菱財団などの援助を受けて行ったものである。

#### 文献

- 1) Aizawa H, Kimura T, Hashimoto K, Yahara O, Okamoto K, Kikuchi K: Basophilic cytoplasmic inclusions in a case of sporadic juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 176: 109-113, 2000
- 2) Brusa R, Zimmermann F, Koh D, Feldmeyer D, Gass P, Seeburg P, Sprengel R: Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science* 270: 1677-1680, 1995
- 3) Feldmeyer D, Kask K, Brusa R, Kornau HC, Kolhekar R, Rozov A, Burnashev N, Jensen V, Hvalby O, Sprengel R, Seeburg PH: Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat Neurosci* 2: 57-64, 1999
- 4) Gerber A, O'Connell M, WK: Two forms of human double-stranded RNA-specific editase 1 (hRED1) generated by the insertion of an Alu cassette. *RNA* 3: 453-463, 1997
- 5) 日出山拓人, 河原行郎, 郭 伸: ALS と AMPA 受容体. *脳神経* 57: 585-598, 2005
- 6) Higuchi M, Maas S, Single FN, Hartner J, Rozov A, Burnashev N, Feldmeyer D, Sprengel R, Seeburg PH: Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* 406: 78-81, 2000
- 7) Jia Z, Agopyan N, Miu P, Xiong Z, Henderson J, Gerlai R, Taverna F, Velumian A, MacDonald J, Carlen P, Abramow-Newerly W, Roder J: Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* 17: 945-956, 1996
- 8) Kawahara Y, Ito K, Ito M, Tsuji S, Kwak S: Novel splice variants of human ADAR2 mRNA: Skipping of the exon encoding the dsRNA-binding domains, and multiple C-terminal splice sites. *Gene* 363: 193-201, 2005
- 9) Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S: Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427: 801, 2004
- 10) Kawahara Y, Ito K, Sun H, Kanazawa I, Kwak S: Low editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain. *Eur J Neurosci* 18: 23-33, 2003a
- 11) Kawahara Y, Kwak S: Excitotoxicity and ALS: what is unique about the AMPA receptors expressed on spinal motor neurons? *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 6: 131-144, 2005
- 12) Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, Aizawa H, Jeong SY, Kanazawa I: Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* 85: 680-689, 2003b
- 13) Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue

- G, Tsuji S, Kwak S : Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *Neurosci Res* 54 : 11-14, 2006
- 14) Kuner R, Groom AJ, Bresink I, Kornau HC, Stefovskaja V, Muller G, Hartmann B, Tschauer K, Waibel S, Ludolph AC, Ikonomidou C, Seeburg PH, Turski L : Late-onset motoneuron disease caused by a functionally modified AMPA receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 5826-5831, 2005
  - 15) 郭 伸 : ALS のグルタミン酸受容体異常と病因との関連について. *運動障害* 14 : 33-41, 2004
  - 16) Kwak S, Kawahara Y : Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med* 83 : 110-120, 2005
  - 17) Kwak S, Weiss JH : Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol* 16 : 281-287, 2006
  - 18) Levine MS, Klapstein GJ, Koppel A, Gruen E, Cepeda C, Vargas ME, Jokel ES, Carpenter EM, Zanjani H, Hurst RS, Efstratiadis A, Zeitlin S, Chesselet MF : Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 58 : 515-532, 1999
  - 19) Liu Y, George CX, Patterson JB, Samuel CE : Functionally distinct double-stranded RNA-binding domains associated with alternative splice site variants of the interferon-inducible double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *J Biol Chem* 272 : 4419-4428, 1997
  - 20) Morton AJ, Leavens W : Mice transgenic for the human Huntington's disease mutation have reduced sensitivity to kainic acid toxicity. *Brain Res Bull* 52 : 51-59, 2000
  - 21) 西本祥仁, 日出山拓人, 河原行郎, 郭 伸 : AMPA 受容体サブユニット GluR2 の RNA 編集と ALS における神経細胞死. *Clini Neurosci* 24 : 222-225, 2006
  - 22) Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS : The GluR2 (GluR-B) hypothesis : Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* 20 : 464-470, 1997
  - 23) Peng PL, Zhong X, Tu W, Soundarapandian MM, Molner P, Zhu D, Lau L, Liu S, Liu F, Lu Y : ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron* 49 : 719-733, 2006
  - 24) Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, Hearn S, Freier SM, Bennett CF, Zhang MQ, Spector DL : Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* 123 : 249-263, 2005
  - 25) Rembach A, Turner BJ, Bruce S, Cheah IK, Scott RL, Lopes EC, Zagami CJ, Beart PM, Cheung NS, Langford SJ, Cheema SS : Antisense peptide nucleic acid targeting GluR3 delays disease onset and progression in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J Neurosci Res* 77 : 573-582, 2004
  - 26) Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. : Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362 : 59-62, 1993
  - 27) Snider BJ, Moss JL, Revilla FJ, Lee CS, Wheeler VC, Macdonald ME, Choi DW : Neocortical neurons cultured from mice with expanded CAG repeats in the huntingtin gene : unaltered vulnerability to excitotoxins and other insults. *Neuroscience* 120 : 617-625, 2003
  - 28) Spalloni A, Albo F, Ferrari F, Mercuri N, Bernardi G, Zona C, Longone P : Cu/Zn-superoxide dismutase (GLY93-->ALA) mutation alters AMPA receptor subunit expression and function and potentiates kainate-mediated toxicity in motor neurons in culture. *Neurobiol Dis* 15 : 340-350, 2004
  - 29) Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I, Kwak S : Slow and selective death of spinal motor neurons *in vivo* by intrathecal infusion of kainic acid : implications for AMPA receptor-mediated excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* 98 : 782-791, 2006
  - 30) Suzuki T, Tsuzuki K, Kameyama K, Kwak S : Recent advances in the study of AMPA receptors. *Folia Pharmacol Jpn* 122 : 515-526, 2003
  - 31) Takuma H, Kwak S, Yoshizawa T, Kanazawa I : Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 46 : 806-815, 1999
  - 32) Tateno M, Sadakata H, Tanaka M, Itohara S, Shin RM, Miura M, Masuda M, Aosaki T, Urushitani M, Misawa H, Takahashi R : Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum Mol Genet* 13 : 2183-2196, 2004
  - 33) Tortarolo M, Grignaschi G, Calvaresi N, Zennaro E, Spaltro G, Colovic M, Fracasso C, Guiso G, Elger B, Schneider H, Seilheimer B, Caccia S, Bendotti C : Glutamate AMPA receptors change in motor neurons of SOD1G93A transgenic mice and their inhibition by a noncompetitive antagonist ameliorates the progression of amyotrophic lateral sclerosis-like disease. *J Neurosci Res* 83 : 134-146, 2006
  - 34) Van Damme P, Braeken D, Callewaert G, Robberecht W, Van Den Bosch L : GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64 : 605-612, 2005
  - 35) Zeron MM, Fernandes HB, Krebs C, Shehadeh J, Wellington CL, Leavitt BR, Baimbridge KG, Hayden MR, Raymond LA : Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* 25 : 469-479, 2004
  - 36) Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, Hayden MR, Raymond LA : Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease.

Neuron 33 : 849-860, 2002

**Abstract**

Molecular mechanism underlying death of motor neurons in sporadic ALS : towards specific therapy

*Shin Kwak*

from

*Department of Neurology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo,  
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan.*

AMPA receptor-mediated neuronal death plays a pivotal role in motor neuron diseases, and an increase of  $Ca^{2+}$  influx has been proposed to initiate the death cascade. Both a decrease of RNA editing at the GluR2 Q/R site and a decrease of relative GluR2 level among AMPA receptor subunits result in an increase of  $Ca^{2+}$ -permeable AMPA receptors expressed on neurons. The former mechanism plays in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS), whereas the latter is the mechanism underlying familial ALS (ALS1) linked to mutated copper-zinc superoxide dismutase gene (*SOD1*). On the other hand, AMPA receptor-mediated mechanism does not seem to play any role in death of motor neurons in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). The difference of molecular mechanism underlying neuronal death in sporadic ALS and ALS1 implies that the effective therapy to ALS1 may not be applicable to sporadic ALS and a specific strategy may be necessary to develop specific therapy for sporadic ALS.

*(Received : August 29, 2006)*

---

Shinkei Kenkyu no Shinpo (Advances in Neurological Sciences), Vol. 50, No. 6, pp902-911, 2006.  
IGAKU-SHOIN Ltd., Tokyo, Japan.