

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症に対する特異治療法の開発

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 郭 伸

平成20年(2008年)4月

目 次

I. 総括研究報告

筋萎縮性側索硬化症に対する特異治療法の開発 ----- 1

郭 伸

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 4

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 6

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
（総括）研究報告書

筋萎縮性側索硬化症に対する特異的治療法の開発に関する研究

（主任）研究者 郭 伸 東京大学助教授

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻 神経内科学助教授

〔研究趣旨〕

孤発性ALSの運動ニューロンで疾患特異的、部位選択的分子変化として我々が見出したGluR2 Q/R部位のRNA編集異常は、神経細胞死を引き起こす一次原因であり、この分子異常を正常化することにより神経細胞死が抑制できることが報告されている。GluR2 Q/R部位のRNA編集は、特異的RNA編集酵素adenosine deaminase acting on RNA type2 (ADAR2)により触媒されることよりADAR2活性が低下していると考えられ、ADAR2活性の賦活によりGluR2 Q/R部位のRNA編集が正常化し、孤発性ALSの神経細胞死を抑制する効果が期待される。本年度の研究において、1) ADAR2活性低下によりGluR2 Q/R部位のRNA編集異常及び緩徐進行性の神経細胞死が引き起こされることを証明した。2) ADAR2活性のin vitroアッセイ系TetHeLaG2m細胞系を開発・確立し、ADAR2活性賦活作用のある候補物質数種類を見出した。3) in vivoにおけるADAR2活性賦活効果判定のために有用な動物モデルADAR2^{flox/flox}/Est1-Creマウスを開発した。4) ADAR2の新規な特異基質としてCYFIP2 K/E siteを発見し、その編集率測定系を確立した。以上の成果により、次年度におけるin vivoにおけるADAR2活性賦活作用の検討のための準備がほぼ完成した。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

相澤仁志 旭川医科大学 講師

A. 研究目的

我々は孤発性ALS脊髄運動ニューロンにおいてグルタミン酸受容体であるAMPA受容体のGluR2サブユニットmRNAにおけるRNA編集が低下していること、これがALS運動ニューロンに疾患特異的かつ細胞選択的な変化であることを報告した(1, 2)。このGluR2 Q/R部位は、RNA編集酵素ADAR2 (adenosine deaminase acting on RNA type 2)により特異的に編集され、ADAR2のノックアウト動物は幼弱期に死亡する(3)。孤発性ALSの脊髄前角組織では、ADAR2 mRNA発現レベルが低下しており、上記のことから、ADAR2活性低下がGluR2 Q/R部位のRNA編集異常を引き起こし、AMPA受容体のCa²⁺透過性を亢進させることを通じて神経細胞死を引き起こしていると考えられる。したがって、ADAR2活性を上げることができれば運動ニューロ

ン死を阻止し、孤発性ALSを治療することが可能であると考えられる。本研究では、孤発性ALSの特異治療法の開発のため、ADAR2活性賦活を測定するためのin vitroおよびin vivoシステムを立ち上げる。

B. 研究方法

in vitroにおけるスクリーニングシステム開発のため、ヒト由来HeLa細胞にGluR2遺伝子のexon11-intron 11-exon 12からなるミニGluR2遺伝子(GluR2-mini)を導入したTet-HeLaG2m細胞系を確立した。薬剤暴露後のGluR2 Q/R部位のRNA編集率、ADAR2 mRNA、GluR2 mRNA/pre-mRNAの発現量の変化を解析した。

In vivo系のスクリーニングシステムとして、tamoxifenによりコンディショナルにADAR2がノックアウトされるADAR2^{flox/flox}/Esrl-Creマウスを開発した。培養細胞におけるADAR1, 2のRNAi、遺伝子導入による検討から、in vivoにおけるADAR2活性を反映する新たな基質を同定した。

（倫理面への配慮）

遺伝子操作に関しては、第二種使用等拡散防止措置における承認を得、全ての遺伝子操作は本学DNA組換え実験指診に従い行った。また動物実験については、東京大学医学部動物委員会の承認を得、実験方法については同動物実験指針に従い動物愛護面に十分配慮した。

C. 研究結果及び考察

Tet-HeLaG2m細胞系を用いて、ADAR2 活性賦活作用のアッセイを行い、数種類の薬剤を得た。これらの作用メカニズムは、ADAR2 mRNA発現量の増加によるもの、ADAR2 mRNA/GluR2 pre-mRNA比の増加によるものの他、これらのADAR2 活性に関連する分子には影響を与えないものがあり、異なる分子メカニズムに依ることが明らかになった。今後、これらの薬剤のin vivoにおける効果をマウスへの投与により判定する必要がある。

ADAR2のコンディショナルノックアウトマウスADAR2^{flox/flox}/VChT-Creマウスの解析により、ADAR2 活性低下により、GluR2 Q/R 部位のRNA編集が低下し、緩徐進行性の運動ニューロン死が起こることを証明した。これは、孤発性ALSにおける運動ニューロン死がADAR2 活性低下によるとする我々の仮説を支持する。新たに開発したADAR2^{flox/flox}/Esrl/ Creマウスは、tamoxifen投与後1ヵ月以内に敬礼を起こし、ADAR2 活性のin vivoスクリーニングシステムとして有用であることが明らかになった。

新たなADAR2 基質としてcytoplasmic FMRP interacting protein 2 (CYFIP2) mRNAのK/E部位を見出した。CYFIP2 mRNAは中枢神経に豊富に発現しており、K/E部位の編集率も70-90%なので(4)、ADAR2の活性変化と共に変化する。そのため、正常神経細胞では編集率が100%に保たれるGluR2 Q/R 部位に比べADAR2 活性の変化をより敏感に反映すると考えられる。したがって、in vivoにおけるADAR2 活性賦活作用を評価する上に有用なパラメータになる。

以上、本研究2年目では、in vitro、in vivoにおけるADAR2 活性のアッセイシステムを確立し、in vivoのスクリーニングにより数種類の候補物質を得た。

D. 結論

ADAR2活性をin vitro、in vivoで評価するシステムを開発し、複数の活性賦活物質候補を得た。

(文献)

1. Kawahara, Y *et al.*, *Nature* **427**, 801 (2004).
2. Kwak & Kawahara, *J Mol Med* **83** : 110-120 (2005)
3. Higuchi, M *et al.*, *Nature* **406**, 78-81 (2000).
4. Nishimoto Y *et al.* *Neurosci Res*

doi:10.1016/j.neures.2008.02.009 (2008)

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Pan W, Ohashi K, Yamamoto Y, Kwak S: Power-law temporal autocorrelation of activity reflects severity of parkinsonism. *Mov Disord* **22**:1308 -1313, 2007.
2. Iwata NK, Aoki S, Okabe S, Arai N, Terao Y, Kwak S, Abe O, Kanazawa I, Tsuji S, Ugawa Y: Evaluation of corticospinal tracts in ALS with diffusion tensor MRI and brainstem stimulation. *Neurology* **70**:528-32, 2008.
3. Nishimoto Y, Yamashita T, Hideyama T, Tsuji S, Suzuki N, Kwak S: Determination of editors of mRNAs with site-selective A-to-I editing positions, *Neurosci Res* doi:10.1016/j.neures.2008.02.009
4. Kwak S, Hideyama T, Yamashita T: AMPA receptor-mediated neuronal death in motor neuron diseases. In: *Amino Acid Receptor Research*, Ed: Paley BF, Warfield TE, Nova Science Publishers Inc. NY. pp 293-310, 2008
5. 相澤仁志、郭 伸: ALS と興奮性アミノ酸、*Brain and Nerve* **59**:1117-1127, 2007.
6. 山下雄也、郭 伸: グルタミン酸受容体と神経細胞死、神経変性疾患のサイエンス、高橋良輔編、南山堂、91-102、2007
7. 日出山拓人、郭 伸: 筋萎縮性側索硬化症のAMPA 受容体仮説、*Annual Review2008 神経*、212-221, 2008

他 6 編

2. 学会発表

1. 郭 伸: RNA 編集と孤発性 ALS における運動ニューロン死、日本薬物動態学会ビジョン・シンポジウム「薬効・毒性・動態 個人間変動の新機軸: Inventions and Innovations in Interindividual Variability of Drug Efficacy, Toxicity and Disposition」、Tokyo, July 19-20, 2007

1. Kwak S. RNA editing and motor neuron diseases. Japan-Korea Neuroscience Symposium "Cutting Edge of Neuroscience" A Satelites Symposium to Neuro2007, Yokohama, September 13, 2007
 2. Hideyama T, Nishimoto Y, Yamashita T, Tsuji S, Takahashi H, Kakita A, Suzuki T, Kwak S: Alteration of RNA editing and neuronal death in motor neuron diseases. **17th Meeting of the European Neurological Society**, Rhodes, Greece, Jun 16-20, 2007
 3. Yamashita T, Tadami C, Nishimoto Y, Kimura D, Suzuki T, Kwak S: Establishment of a novel Hela cell line stably expressing the half-edited GluR2 transcript, **37th Annual Meeting Society for Neuroscience**, San Diego, 3-7 November 2007, *Abstr Neurosci* 591.16, 2007
 4. Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Takahashi R, Misawa H, Suzuki T, Kwak S: Death of motor neurons in mice deficient in an RNA editing enzyme, **The 18th International Symposium on MND/ALS. 2007**, Tronto, 30 Nov-2 Des, 2007
 5. 日出山拓人、西本祥仁、山下雄也、伊藤杏子、辻省次、高橋良輔、三澤日出巳、鈴木岳之、郭伸：孤発性筋萎縮性側索硬化症の RNA 編集異常、第 48 回日本神経学会総会、名古屋、16-18 May 2007
 6. 西本祥仁、日出山拓人、山下雄也、鈴木則宏、郭伸：孤発性 ALS のバイオマーカーの開発、第 48 回日本神経学会総会、名古屋、16-18 May 2007
 7. 澤田潤、相澤仁志、油川陽子、郭伸：AMPA 受容体サブユニット GluR2 の Q/R サイト RNA 編集率に及ぼす各種薬剤の効果、第 48 回日本神経学会総会、名古屋、16-18 May 2007
 8. Hideyama T, Nishimoto Y, Yamashita T, Kakita A, Takahashi H, Tsuji S, Kwak S: RNA editing and ADAR2 in sporadic ALS、NEURO-COE RETREAT 2007、Hakone、13-15、July, 2007.
 9. 山下雄也、只見智恵子、西本祥仁、木村大輔、鈴木岳之、郭伸：Tet-On システムを利用した AMPA 受容体サブユニット GluR2 の RNA 編集率測定株の樹立第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会、第 17 回日本神経回路学会大会、横浜、10-12 September 2007
 10. 郭伸、日出山拓人、西本祥仁、山下雄也、辻省次、高橋良輔、三澤日出巳、鈴木岳之：RNA 編集異常による孤発性 ALS モデルマウスの開発と検討 Neuro2007 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会、第 17 回日本神経回路学会大会、横浜、10-12 September 2007.
 11. 木村大輔、日出山拓人、鈴木岳之、郭伸：タモキシフェン誘導性ノックアウトマウスを用いた孤発性 ALS の神経細胞死の検討、第 81 回薬理学会年会、横浜、March 17-19, 2008
- 他 5 編

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山下雄也、 郭 伸	神経細胞死とグルタミン酸受容体	高橋良輔	神経変性疾患のサイエンス	南山堂	東京	2007	91-102
日出山拓人、 郭 伸	筋萎縮性側索硬化症のAMPA受容体仮説	柳澤信夫 他	Annual Review 神経 2008	中外医学社	東京	2008	212-221

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Pan W, Ohashi K, Yamamoto <u>Kwak S</u>	Power-law temporal autocorrelation of activity reflects severity of parkinsonism	<i>Mov Disord</i>	22	1308-1313	2007
<u>Aizawa H</u>	Gabapentin for painful legs and moving to es syndrome	<i>Internal Med</i>	46	1937	2007
Sawada J, Nakatani-Enomoto S, <u>Aizawa H</u> , Katayama T, Ito T, Aburakawa Y, Kikuchi K	An adult case of relapsing human herpesvirus-6 encephalitis	<i>Internal Med</i>	46	1617-1620	2007
Sumitomo K, Shishido N, <u>Aizawa H</u> , Hasebe N, Kikuchi K, Nakamura M	Effects of MCI-186 upon neutrophil-derived active oxygens	<i>Redox Rep</i>	12	189-194	2007
Saito T, Amakusa Y, Kimura T, Yahara O, <u>Aizawa H</u> , Ikeda Y, Day JW, Ranum LP, Ohno K, Matsuura T	Myotonic dystrophy type 2 in Japan: ancestral origin distinct from Caucasian families	<i>Neurogenetics</i>	9	61-63	2008
Iwata N.K, Aoki S, Okabe S, Arai N, Terao Y, <u>Kwak S</u> , Abe O, Kanazawa I, Tsuji S, Ugawa Y	Evaluation of corticospinal tracts in ALS with diffusion tensor MRI and brainstem stimulation	<i>Neurology</i>	70	528-532	2008

Ishiura H, Morikawa M, Hamada M, Watanabe T, Kako S, Chiba S, Motokura T, Hangai A, Shibahara J, Akahane M, Goto J, Kwak S, Kurokawa M, Tsuji S	Lymphomatoid Granulomatosis Involving Central Nervous System Successfully Treated with Rituximab Alone	<i>Arch Neurol</i>		印刷中	
Nishimoto Y, Yamashita T, Hideyama T, Tsuji S, Suzuki N, Kwak S	Determination of editors of mRNAs with site-selective A-to-I editing positions	<i>Neurosci Res</i>		印刷中	
日出山拓人、郭 伸	孤発性ALSの病因	難病と在宅ケア	13	7-10	2007
相澤仁志、郭 伸	ALSと興奮性アミノ酸	Brain and Nerve	59	1117-1127	2007
日出山拓人、郭 伸	孤発性ALSと興奮性アミノ酸	Clinical Neuroscience	26	303-5	2008
郭 伸、Struzik ZR、相馬りか、大橋恭子、潘衛東、山本義春	電気的前庭神経刺激による神経疾患の治療の試み	ER誌	66	印刷中	



9 神経細胞死と グルタミン酸受容体

山下雄也 郭 伸

要旨

脳血管障害のような急性疾患や、筋萎縮性側索硬化症 amyotrophic lateral sclerosis (ALS) のような慢性変性疾患で、受容体の過剰な活性化（興奮毒性）や、チャネル特性の変化によるグルタミン酸神経伝達システムの異常が神経変性の一因となること、関わる受容体によっては神経保護的に働くものもあることがわかってきた。とくに神経細胞死との関連で近年注目されてきたのは、イオンチャネル型グルタミン酸受容体 ionotropic glutamate receptor のサブタイプである AMPA 受容体で、チャネルのほとんどは Ca^{2+} 非透過性であるが、 Ca^{2+} 透過性を示す AMPA 型チャネルがあり、これらの疾患における神経細胞死と深く関連する知見が積み重ねられてきている。前者は比較的広汎に発現するが、 Ca^{2+} 透過性を示す AMPA 型チャネルはある種の神経細胞クラスで発現し、とくに ALS と脳血管障害において死にゆく神経細胞で増加することが明らかにされた。加えて、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 型チャネルは NMDA 受容体のように Mg^{2+} によって遮断されないが、 Zn^{2+} には高い透過性を示し、AMPA 受容体を介する神経細胞死に何らかの役割をもっている可能性がある。したがって、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 型チャネルは神経疾患に対する新たな特異治療法開発の標的になることが期待できる。

キーワード

- 興奮性神経細胞死仮説
- AMPA 受容体
- 筋萎縮性側索硬化症 (ALS)
- RNA 編集
- ADAR

9-1 はじめに

興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸が過剰に細胞外に放出されると神経細胞は傷つき、中枢神経系のいくつかの疾患において神経変性の一因となる。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) においてグルタミン酸の毒性が高くなることはアストロサイトのグルタミン酸トランスポーターの減少あるいは異常に起因するとする仮説もこの興奮毒性説に基づいている。脳虚血において、アストロサイトのグルタミン酸トランスポーター阻害や、逆向き輸送による細胞内グルタミン酸の放出は、神経細胞外グルタミン酸濃度の上昇をひき起こす。グルタミン酸はシナプス後膜にあるイオンチャネル型受容体の多くを活性化する。イオンチャネル型受容体の中で最も顕著な作用をもつものは NMDA 型グルタミン酸チャネルと AMPA 型グルタミン酸チャネルである。NMDA 型グルタミン酸

チャンネルは高い Ca^{2+} 透過性をもつが、AMPA 型グルタミン酸チャンネルは最も速い興奮性神経伝達を仲介するものの通常は Ca^{2+} 非透過性である。しかしながら AMPA 型チャンネルの中には Ca^{2+} 透過性のものがあり、とくにある種の神経細胞クラスに多く発現し、ALS や脳虚血ではこの AMPA 受容体サブタイプが神経細胞死をひき起こす主体であることを最近の証拠が示唆している。

Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネル数はシナプス活性の生理学的パターンに応答し、またある種の病理状態により制御を受けることが示されている。海馬での Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネルの生理的局在は抑制性介在ニューロンであり、錐体細胞にはほとんど存在しないが、脳虚血のあと、チャンネル数は急激に増加する。対照的に、脊髄運動ニューロンは、通常 Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネルを相当数もっているが、ALS でかなり増加していることが示唆されている¹⁾。本章においては、グルタミン酸受容体と神経変性の関係を示しながら、疾患における Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネルの役割に対する最近の証拠、とくに ALS と脳虚血における Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネルの役割に焦点を絞り興味深い手がかりについて概観してみたい。

9-2。グルタミン酸受容体の構造と機能

シナプス小胞からシナプス間隙に放出された神経伝達物質は、拡散してシナプス後膜上に存在する受容体に結合する。中枢神経系において主な興奮性神経伝達物質は、グルタミン酸であり、神経細胞において速い興奮性神経伝達を行い、神経活動の中心的な役割を果たしている。グルタミン酸受容体は、イオンチャンネルを分子内にもつイオンチャンネル型受容体と G タンパク質を介してイオンチャンネル、酵素、他の受容体などを調節する代謝調節型受容体の 2 種類に分類される。

キーワード解説

- **興奮性神経細胞死仮説**：グルタミン酸受容体の過剰な興奮により Ca^{2+} の流入が起こり、持続的に細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇し、細胞死をひき起こすという仮説。
- **AMPA 受容体**：イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の一つで、興奮性神経伝達に関与する。AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) の他にカイン酸にも反応する。4 種類のサブユニット GluR1~GluR4 から成る四量体のサブユニット構造をとり、ほとんどは Ca^{2+} 非透過性だが透過性のタイプが存在し、後者は神経細胞死に関わる。
- **筋萎縮性側索硬化症 amyotrophic lateral sclerosis (ALS)**：上位・下位運動神経がともに侵されて筋肉が萎縮し、とくに呼吸筋の麻痺のため生命予後のきわめて悪い神経難病。有病率 5/10 万人のうち 90% 以上は孤発性で、遺伝性の ALS の 5 遺伝子異常が同定されているが、既知の点任遺伝子はいずれも孤発性 ALS の病因との関連性が否定されている。
- **RNA 編集**：DNA より転写された premRNA は一塩基置換や多塩基の挿入・欠失などの修飾を受けることがあり、これによりコドンに特有のタンパク質の構造や機能に多様性が与えられる場合がある。このような転写後の RNA 修飾を RNA 編集とよぶ。
- **ADAR (adenosine deaminase acting on RNA)**：二本鎖 RNA を基質としてアデノシン→イノシンの一塩基置換 (RNA 編集) を触媒する酵素。遺伝子の相同性から 3 種が知られている。

1 イオンチャネル型受容体

イオンチャネル型グルタミン酸受容体はさらに AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) 受容体, NMDA (*N*-methyl-D-aspartic acid) 受容体, カイニン酸 kainic acid (KA) 受容体に分類され, これらの名称は, 薬物が選択的アゴニストとして働くことから名づけられている。その後, 遺伝子解析が行われ, 遺伝子配列相同性, 構成チャネルの薬理学的特性をもとにした分類が行われた。その結果, この分類は薬理学的性質とよく一致し, GluR1~4が AMPA 型, GluR5~7と KA1, KA2がカイニン酸型, GluR ϵ 1~4 (NR2) と GluR ζ 1 (NR1), NR3A, NR3Bが NMDA 型グルタミン酸受容体を形成するサブユニットであると分類された。遺伝子クローニングから GluR δ 1, GluR δ 2が同定されているが, その分子機能についてはまだ明らかになっていない²⁾。GluR δ 2はノックアウトマウスの研究から, 小脳プルキンエ細胞に特異的に発現し, 小脳シナプス可塑性, 運動学習, シナプス回路網形成に重要な役割を担っていることが明らかにされている³⁾。

これらのイオンチャネル型受容体サブユニットの構造は四つの膜領域をもち, その第二膜領域 (M2) は細胞膜を貫通せずに膜に1度入ってまた細胞内に出るループ状の構造をとる。M2はイオンチャネルの内壁を構成し, イオン透過選択性を決定している。N末端細胞外領域には, M1近傍のN末端領域とM3~M4間で構成される領域にグルタミン酸結合領域をもつことが明らかにされている (図9-1a)。C末端細胞内領域には, リン酸化, 脱リン酸化を受ける部位とタンパク質結合ドメインが同定されていて, それらはチャネルのシナプスへの輸送制御やシグナル伝達制御にかかわっている²⁾。

2 代謝調節型受容体

代謝調節型受容体はチャネル活性をもたないが, グルタミン酸が結合することにより, 細胞内のセカンドメッセンジャーの産生を調節する受容体である。代謝調節型受容体は8種類, mGluR1からmGluR8がクローニングされている。mGluRはアミノ酸配列, アゴニストの薬理学的性質, それぞれの受容体のシグナル伝達系などからグループI~IIIの三つに分類されている。グループIは, mGluR1とmGluR5, グループIIは, mGluR2とmGluR3, グループIIIは, mGluR4, mGluR6~8から構成される。グループIはGタンパク質のG_qを介してホスホリパーゼCを活性化し, イノシトール1,4,5-トリリン酸 inositol triphosphate (IP₃) を産生し, 細胞内からCa²⁺を放出する。グループII, グループIIIはGタンパク質のG_iを介し, アデニル酸シクラーゼを抑制しK⁺, Ca²⁺チャネルを調整することから分類されている⁴⁾。

これらの代謝調節型受容体サブユニットの構造は7回膜貫通型の構造をもち, N末端細胞外領域には, TM1近傍のN末端領域にグルタミン酸の結合領域があり, TM5-TM6間にGタンパク質結合部位をもつ (図9-1b)。

代謝調節型受容体のシグナル伝達によりcAMP応答配列結合タンパク質 cAMP response element-binding protein (CREB) などの転写制御因子の活性化による遺伝子発現を介して神経細胞の可塑性制御に関わっていることが知られている。さらにCa²⁺の放出に伴うCa²⁺-カルモジュリン依存性リン酸化酵素 (CaMK II) の活性化によってイオンチャネル活性や遺伝子発現が調節され, シナプス伝達の効率の変化に関与してい

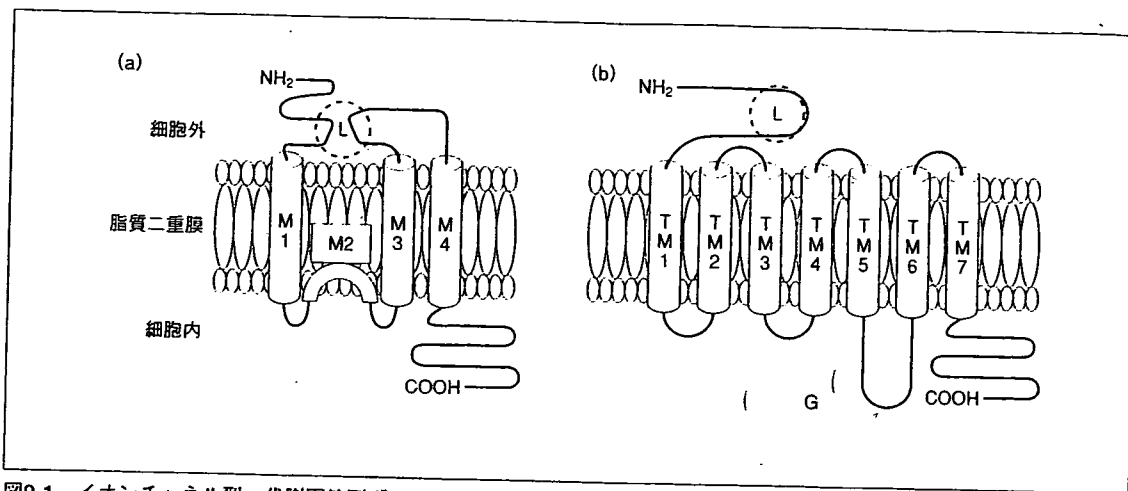


図9-1 イオンチャネル型、代謝調節型グルタミン酸受容体サブユニットの構造

(a) イオンチャネル型グルタミン酸受容体サブユニットの構造. グルタミン酸の結合予想部位がM1近傍のN末端領域とM3-M4間で形成される. M2は短い膜貫通ドメインで膜の中でループ構造をとり、両端が細胞内に面している. (b) 代謝調節型グルタミン酸受容体サブユニットの構造. 7回膜貫通型の構造をもつ. TM1近傍のN末端領域にグルタミン酸の結合予想領域がある. TM5-TM6間にGタンパク質結合部位をもつ. Gタンパク質にシグナルが送られることでシグナル伝達系が機能する. Mは疎水性領域. Lはグルタミン酸結合予想部位. TMは膜貫通領域.

ることがわかっている⁵⁾.

以上のように代謝調節型受容体は神経機能調節に関与し、神経細胞死に対しても、惹起される受容体グループにより促進的にも抑制的にも働かうるが、調節因子としての役割であり、細胞の生死を決める主役ではないようである. ここからは神経変性への関与が明らかになっているグルタミン酸受容体のうちAMPA受容体に着目し話を進めたい.

9-3 Ca²⁺透過性AMPAチャネルの制御

AMPA受容体はGluR1, GluR2, GluR3, GluR4の四つのサブユニットで構成され、同種あるいは異種の組み合わせで、四量体を形成し機能する. AMPA受容体のCa²⁺透過性はGluR2サブユニットがあるかどうかで大きく異なり、AMPA受容体に一つでもGluR2サブユニットが含まれるとCa²⁺透過性は低くなり、全く存在しないと透過性が高くなる⁶⁾. GluR2のこのような性質はM2にあるQ/R部位が他のサブユニットと異なるために獲得される. つまり、GluR2の遺伝子には他のサブユニットと同様に、グルタミン(Q)がコードされているにもかかわらず、実際には転写後にRNA編集⁷⁾という修飾を受け、タンパク質レベルではアルギニン(R)に一塩基置換されることによる. すなわち、アルギニンは陽性アミノ酸なので、チャネルのポア部分にアルギニンが存在することでCa²⁺の透過を阻害する⁸⁾ (図9-2).

成体ラット、マウス、ヒトの脳からのRNA分析から神経細胞では、ほとんどすべてのGluR2 mRNAが編集されている. しかしながらGluR1, GluR3, GluR4のサブユニットにおいてはこの重要な位置がグルタミンのままである. したがって、GluR2を含まないAMPA受容体や、GluR2を含んでいても未編集であると(GluR2Q), そのAMPA

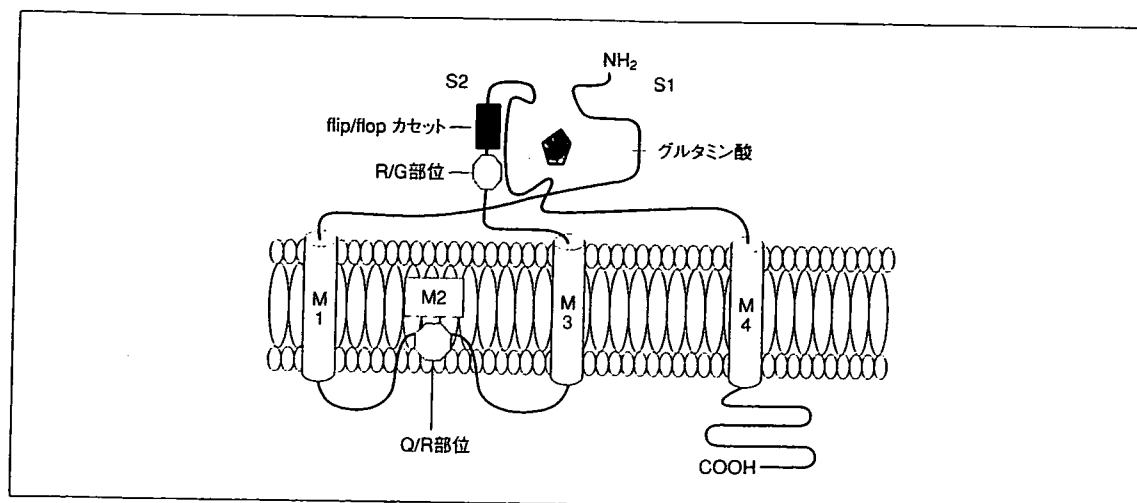


図9-2 グルタミン酸受容体サブユニットの構造

GluR2のサブユニット構造。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。Q/R部位がQになるとCa²⁺を透過しない、それに対して編集されたRになるとCa²⁺を透過する。Flip/flopは選択的スプライシングによって制御を受ける。脱感作の時間に影響を与え、細胞内Ca²⁺量に影響する。S1, S2はグルタミン酸の結合部位。Mは疎水性領域。[西本祥仁ら: Clinical Neuroscience, 24:222-225, 2006を一部改変]

受容体は高いCa²⁺透過性をもつ⁹⁾。

通常の状況下で、ほとんどのニューロンはCa²⁺透過性のAMPAチャネルをもたない。つまり編集されたGluR2サブユニットがAMPAチャネルに含まれていることを表し、それゆえ、アルギニンがCa²⁺の流入を阻害している。さらにAMPAチャネルは静的でなく、多くのメカニズムを通してダイナミックな制御を受けている。AMPAチャネル量は細胞質からシナプス膜上間の受容体の輸送変化によって制御され、GluR2に関する特異的なタンパク質-タンパク質の結合に依存するメカニズムを通して起こっている。したがってGluR2の発現量はこのような受容体輸送に影響するのみならず、サブユニット同士の会合にも影響を与えている。さらに、AMPA受容体のシナプス膜表面への挿入や、サブユニット同士の会合効率はGluR2 Q/R部位の編集状態に依存し、編集型のGluR2(R)より、未編集型のGluR2(Q)の方が、細胞膜表面への輸送効率が高いため、シナプス上に提示された機能的なCa²⁺透過性のAMPAチャネルの比率はGluR2のRNA編集により大きく影響を受ける^{6),10),11)}。したがって、GluR2の発現量、RNA編集率は機能的Ca²⁺透過性AMPA受容体の発現に大きく影響する。生理学的な活性は、シナプス後膜にあるCa²⁺透過性のAMPAチャネルの数が減少した結果であるという研究¹¹⁾とは対照的に、最近の研究ではTNF- α (tumor necrosis factor- α) とよばれるサイトカインの存在がいくつかのニューロンにおいてCa²⁺透過性のAMPAチャネルの膜への挿入を促進することがわかった。このメカニズムは、このサイトカインの上昇に伴う病理的な状況において神経傷害を促進するのかもしれない¹²⁾。すなわち、Ca²⁺透過性のAMPAチャネル数は、GluR2 mRNAの発現量によって調節される場合と¹³⁾、GluR2 mRNAの編集効率によって調節される場合が想定される¹⁴⁾。

9-4 ◦ Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネル活性とニューロン傷害

興奮性神経傷害のメカニズムは複雑で完全には解明されていないが、細胞内の Ca^{2+} の過剰負荷が重要な引き金になっている。実質的な細胞内 Ca^{2+} 負荷があれば、 Ca^{2+} はミトコンドリアに取り込まれ、活性酸素種 reactive oxygen species (ROS) の産生あるいはミトコンドリア膜を通過する透過型のチャネルを開放し、シトクロム c のようなアポトーシス媒介物の放出をひき起こす。適度な細胞内 Ca^{2+} 蓄積を超えれば、傷害は他のメカニズムによっても媒介される。つまり、NOS (NO 合成酵素) の活性化から一酸化窒素 NO が産生され、結果的にポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼを活性化し、ミトコンドリアがアポトーシス誘導因子を放出するメカニズムをひき起こす¹⁵⁾。

以下に示す理由から、 Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルは NMDA チャネルより神経変性に大きな役割を果たすと考えられている。

一つは孤発性 ALS と脳虚血で起こっている Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネル数の増加であり、新しい代謝負荷をニューロンに受けさせ、おそらく変性の方向へバランスを傾ける。二つ目は、NMDA チャネルは Mg^{2+} によって電圧依存的にブロックされているので NMDA チャネルは強いシナプス後脱分極がないと Ca^{2+} はほとんど流入しない。

Ca^{2+} の流入のみでは神経細胞死が起こりにくいことから、生理的に存在する 2 価イオンである Zn^{2+} の神経毒性が検討され、 Ca^{2+} に比してもより強力なミトコンドリア毒性があることが示されている。そのメカニズムも Ca^{2+} に似て、酵素による誘導、活性酸素種の産生やポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼの活性化などを通して神経傷害を誘導する。 Zn^{2+} はある種の興奮性シナプスでグルタミン酸とともに放出され、 Ca^{2+} 透過性の AMPA チャネルを通じて細胞内に取り込まれる。脳虚血とてんかんでは海馬の錐体細胞で Zn^{2+} が蓄積され、両疾患の患者で、亜鉛のキレート剤は神経保護作用を示すことが報告されている¹⁶⁾。

9-5 ◦ 神経変性と疾患

① 運動ニューロン：筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と他の運動ニューロン疾患

脊髄運動ニューロンの細胞死には Ca^{2+} 透過性の AMPA 受容体を介する神経細胞死が大きく関与することが、*in vivo* 系¹⁷⁾、*in vitro* 系¹⁸⁾ での動物実験から知られている。おそらくこの脆弱性は運動ニューロンが他の神経細胞クラスに比べ、より多い Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルをもつという事実によるものと考えられる。さらにこのことは、ヒトやラットにおいて運動ニューロンと他の神経サブクラスを比較したとき運動ニューロンの GluR2 mRNA の発現量が相対的に低いという報告とも一致している^{19), 20)}。

したがって、 Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネル数の増加は疾患を惹起したり促進させたりすると考えられる。前述したように、 Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネル数を増加させるメカニズムは一通りではなく、GluR2 mRNA の発現量の減少によって増加する場合と¹³⁾、GluR2 mRNA の編集率低下によって増加する場合がある¹⁴⁾。

以下に示す知見の多くは、前者のメカニズムによる Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネル増加が多種多様な状況で運動ニューロン変性に主要な役割をもつことを示している。脊髄

前根の引き抜き損傷実験では GluR2 タンパク質が選択的に減少し、運動ニューロン死をひき起こすので²¹⁾、GluR2 タンパク質の減少が運動ニューロン傷害をひき起こすことが示唆される。ウイルス誘導性の運動ニューロン変性モデルで Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルブロッカーは保護的に働く²²⁾。つまり、 Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネル活性が運動ニューロン変性を制御することがわかる。ラット脊髄クモ膜下腔にカイニン酸を 4~8 週間持続的に投与すると、運動ニューロンに選択的な神経変性が起こる¹⁸⁾。このラットの運動ニューロンでは、GluR3 mRNA の発現量が増加しており、他のサブユニットには変化がないので、GluR2 の比率が下がり、その結果 Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルがさらに増加したための細胞死であろうと考えられ、カイニン酸の慢性毒性は Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルを増加させるメカニズムを通じてのものであることが示唆される。

これに対して、後者の、GluR2 mRNA の編集率低下によるメカニズムは、特異的に GluR2 を改変した遺伝子 GluR-B(N) を導入し、結果的に Ca^{2+} 透過性を増強した AMPA チャネルを産生する GluR-B(N) マウス²³⁾ で、緩徐進行性の運動ニューロン死が生じ、生後12カ月で運動ニューロン疾患様の表現型を示した例により示されている。

したがって、運動ニューロンを傷害する運動ニューロン疾患においても、 Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネル増加には異なるメカニズムが働いている可能性がある。

このメカニズムを解明するために、われわれは剖検脳脊髄からレーザーマイクロダイセクションで単一運動ニューロンを切り出した組織で定量的 RT-PCR 法により検討を加えたところ、孤発性 ALS 患者では GluR2 mRNA 発現量あるいは AMPA 受容体各サブユニットの mRNA 発現量に対する GluR2 mRNA 発現量の比は正常対照と違いはなかった¹⁹⁾ が、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が減少していることがわかった^{14), 24)}。すなわち、孤発性 ALS では GluR2 mRNA の編集率低下のメカニズムにより Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルが増加し、細胞死をひき起こすと考えられる²⁵⁾。

一方、他の運動ニューロン疾患の運動ニューロンで同様の検索をしたところ、家族性 ALS のモデル動物である変異 SOD1 (G93A と H46R) トランスジェニックラットでは変性した運動ニューロンでも GluR2 mRNA は完全に編集されていた²⁶⁾。ただし、*in vivo* トランスジェニック動物を用いた研究から SOD1 に関連した家族性 ALS において Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルと運動ニューロン死の間の関連性が数多く報告されている。すなわち、すでに述べた GluR-B(N) マウス²³⁾、あるいは GluR2 を完全に欠乏させたマウスと ALS の変異 SOD1 (G93A) マウスをかけ合わせると、運動ニューロンの脱落が顕著に加速する²⁷⁾。逆に、運動ニューロンで Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルの数を減少させたマウスと変異 SOD1 (G93A) マウスをかけ合わせると、運動ニューロンの脱落が優位に遅くなる²⁸⁾ などの報告である。先に述べたように変異 SOD1 による運動ニューロン死には、GluR2 RNA 編集異常は関与していないので²⁶⁾、GluR2 発現量低下が Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルを増加させている可能性が高い。G93A SOD1 トランスジェニックマウスでは、GluR3 が増加しているという報告は、このメカニズムを支持するものであり^{29), 30)}、前述のカイニン酸髄注ラットにみられたと同じ GluR2 欠乏による Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネル増加のメカニズムが SOD1 遺伝子にリンクした家族性 ALS の運動ニューロンにも働いていることを示唆する。孤発性 ALS と SOD1 関連家族性 ALS とでは、同じ AMPA 受容体を介する細胞死ではあってもメカニズムが異なることを示し

ている。

このように孤発性 ALS と SOD1 関連家族性 ALS では、 Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルを介した運動ニューロン死のメカニズムが異なることに加えて、もう一つの運動ニューロン疾患である球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) における運動ニューロン死には Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルを介したメカニズムが働いていないことが明らかにされ²³⁾、運動ニューロン死のメカニズムは一様ではないことが示されている。SBMA における運動ニューロン死は、異常に伸長したポリグルタミン鎖が引き起こす細胞死であり、われわれが検討した他のポリグルタミン病である歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 spinal and bulbar muscular atrophy (DRPLA) のプルキンエ細胞でも GluR2 RNA 編集は 100% に保たれており、ポリグルタミン病には Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルを介したメカニズムは働いていないようである (図9-3)^{14), 31)}。

Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルが運動ニューロン傷害をひき起こすメカニズムの一つに、運動ニューロンは細胞質のカルシウム結合タンパク質が少なく Ca^{2+} 負荷をほとんど緩衝しないことが関与している可能性がある。すなわち、流入した Ca^{2+} がミトコンドリアに入り、強い活性酸素種 (ROS) を産生することで細胞を傷害する可能性である。産生された ROS は周囲のアストロサイトのグルタミン酸トランスポーターの機能障害をひき起こすことも考えられる^{1), 15)}。

2 脳虚血

一過性前脳虚血後、海馬 CA1 錐体細胞は、遅発性神経細胞死に陥る。この遅発性神経細胞死のメカニズムには従来 GluR2 mRNA の減少が関与しているという説が有力であり (図9-3)、この仮説を指示する結果が蓄積されている。GluR2 タンパク質量が減少し、AMPA チャネル依存的な Ca^{2+} 電流が脳虚血後に増加すること、CA1 領域において、 Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネル数の増加は虚血傷害への海馬錐体細胞の脆弱性を増すが³²⁾、一方で GluR2 タンパク質量を増加させると神経保護作用を示すこと³³⁾、最後に、脳虚血導入後、数時間から数日までの間に Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルの阻害剤を加えると神経保護作用が観察されることなどである³⁴⁾。このことは脳虚血後数日以内に Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルをターゲットとする新しい治療を行うと、ヒト神経疾患への治療効果が望めることを示唆している¹⁾。

Ca^{2+} 負荷のみでは神経細胞死は起こらないことから、 Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルを介した細胞死を疑問視する向きがあったが、最近、 Zn^{2+} がこの遅延性の選択的神経変性に多様な役割をもつことが示唆され、これらの 2 価イオンの細胞毒性が検討されている。急性の脳虚血の *in vitro* スライスモデルにおいて、細胞外の Zn^{2+} キレート剤あるいは Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルの阻害剤のどちらかを加えると Zn^{2+} の蓄積と結果的に起こる神経傷害の両方が減少する¹⁶⁾。さらに *in vivo* の動物モデルにおいて、脳虚血の前あるいは、脳虚血後数時間ではなく数日のうちに、細胞外の Zn^{2+} キレート剤を加えると GluR2 の発現量減少を弱める作用により神経保護的に働くことが報告され、 Zn^{2+} には Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルを増やす作用があることが示唆される。一方で Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネル数がすでに増加してしまった後でもキレート剤は細胞内 Zn^{2+} の遅発性の上昇を弱め、細胞内 Zn^{2+} 蓄積による Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネル増加によ

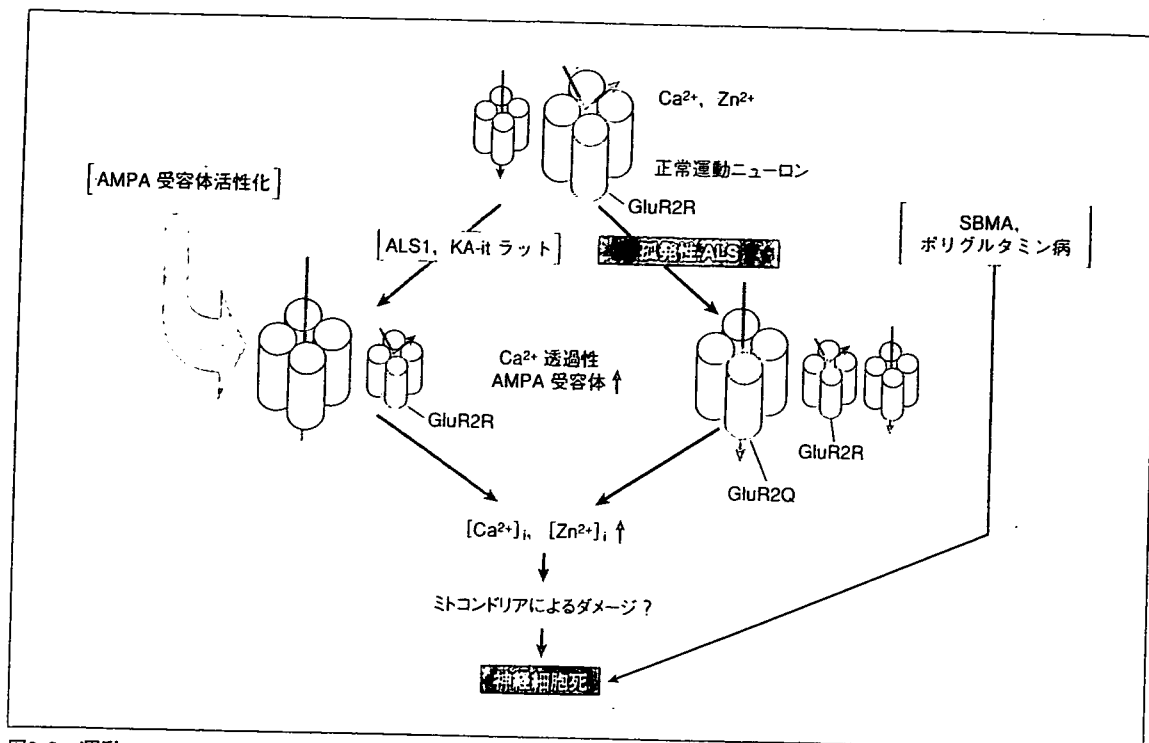


図9-3 運動ニューロン死のさまざまな分子機構

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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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)、Ca²⁺ 透過性の AMPA 受容体が増加し、細胞内 Ca²⁺ (Zn²⁺) 濃度が上昇することが神経細胞死をひき起こす。ただし、後者が単独で神経細胞死をひき起こしうるのに対し、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。

る遅延傷害を阻止する³⁵⁾。

以上は GluR2 発現量低下による Ca²⁺ 透過性 AMPA チャネル増加のメカニズムを示している。一方、最近の研究で成体ラットの前頭葉脳虚血後に遅発性神経細胞死を生ずる海馬 CA1 錐体細胞では、GluR2 サブユニットの Q/R 部位編集と ADAR2 mRNA 量が選択的に減少していることが報告され、虚血後の遅発性神経細胞死においても GluR2 mRNA 編集低下による Ca²⁺ 透過性 AMPA チャネル増加のメカニズムが働いていることが示された³⁶⁾。

孤発性 ALS 運動ニューロンと虚血後の海馬 CA1 錐体細胞で同様の分子変化がみられることは、これら 2 種の神経細胞は未編集 GluR2 の増加による Ca²⁺ 透過性 AMPA チャネルを介した神経細胞死に、特に脆弱であることを示すのみならず、虚血に類似した環境因子が孤発性 ALS の運動ニューロン死をひき起こしうることをも示唆している。

9-6 ○ 神経変性疾患と治療

上記のような最近の知見から Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネルの増加は孤発性 ALS や脳虚血における神経変性に大きく寄与していることがわかる。 Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネルの増加のメカニズムは単一ではなく、GluR2 mRNA の編集異常、GluR2 の mRNA の減少（絶対量ないし、AMPA 受容体サブユニットに占める割合）がある（図9-3）。孤発性 ALS の運動ニューロン死は前者のメカニズムにより、前脳虚血後の海馬 CA1 錐体細胞の細胞死は両者のメカニズムが報告され、後者の例は SOD1 関連家族性 ALS の運動ニューロン、カイン酸持続刺激による運動ニューロン死が挙げられる。後者のメカニズムによる Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネルの増加が想定されている疾患としては、てんかんやアルツハイマー病なども挙げられるかもしれない。

このように Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネルの増加が神経細胞死をひき起こすことが明らかである以上、このチャンネルの活性を抑制する、このチャンネルの増加を阻止するなどが疾患治療の戦略となりうる。現在のところ、ヒトへの臨床試験あるいは動物における全身投薬に利用できる Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネルへの選択的なアンタゴニストはない。しかし、適切なアンタゴニストであれば、NMDA 受容体の興奮あるいは完全な AMPA チャンネルを完全に遮断することなしに Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネルを通る電流を遮断することは理論的に可能なので、増加した Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネルを遮断することは、障害部位に対する標的治療になり、治療戦略としても魅力的である¹⁾。また、孤発性 ALS などにみられる Ca^{2+} 透過性 AMPA チャンネル数増加は、RNA 編集の結果によりひき起こされるものであり、チャンネル数の正常化による治療戦略も考えられる。

● 文献

- 1) Kwak S, Weiss JH: Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 16: 281-287, 2006.
- 2) Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF: The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological. Rev.*, 51: 7-61, 1999.
- 3) Takeuchi T, Miyazaki T, Watanabe M, Mori H, Sakimura K, Mishina M: Control of synaptic connection by glutamate receptor delta2 in the adult cerebellum. *J. Neurosci.*, 25: 2146-2156, 2005.
- 4) Hollmann M, Heinemann S: Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17: 31-108, 1994.
- 5) Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, Ueda Y, Nakahara K, Watanabe D, Yamaguchi S, Kawabata S, Okada M: Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 26: 230-235, 1998.
- 6) 鈴木岳之, 都筑馨介, 亀山仁彦, 郭仲: AMPA 受容体の生理機能——受容体機能発現から疾患まで——. *日本薬理学雑誌*, 122: 515-526, 2003.
- 7) 西本祥仁, 日出山拓人, 河原行郎, 郭仲: ALS における分子生物学的変化. *医学のあゆみ*, 215: 3514-3518, 2005.
- 8) 西本祥仁, 日出山拓人, 河原行郎, 郭仲: 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. *Clinical Neuroscience*, 24: 222-225, 2006.
- 9) 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.
- 10) Greger IH, Khatri L, Ziff EB: RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron*, 34: 759-772, 2002.
- 11) Greger IH, Khatri L, Kong X, Ziff EB: AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron*, 40: 763-774, 2003.

- 12) Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC: Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *J. Neurosci.*, 25: 3219-3228, 2005.
- 13) Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS: The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.*, 20: 464-470, 1997.
- 14) 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.
- 15) Rao SD, Weiss JH: Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci.*, 27: 17-23, 2004.
- 16) Yin HZ, Sensi SL, Ogoshi F, Weiss JH: Blockade of Ca^{2+} -permeable AMPA/kainate channels decreases oxygenglucose deprivation-induced Zn^{2+} accumulation and neuronal loss in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, 22: 1273-1279, 2002.
- 17) Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH: Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J. Neurosci.*, 16: 4069-4079, 1996.
- 18) 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.
- 19) Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, Aizawa H, Jeong S-Y, Kanazawa I: Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: An implication for excitotoxicity in ALS. *J. Neurochem.*, 85: 680-689, 2003.
- 20) Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I, Kwak S: Expression profile of AMPA receptor subunit mRNA in single adult rat brain and spinal cord neurons in situ. *Neurosci. Res.*, 52: 228-234, 2005.
- 21) Nagano I, Murakami T, Shiote M, Abe K, Itoyama Y: Ventral root avulsion leads to downregulation of GluR2 subunit in spinal motoneurons in adult rats. *Neuroscience*, 117: 139-146, 2003.
- 22) Darman J, Backovic S, Dike S, Maragakis NJ, Krishnan C, Rothstein JD, Irani DN, Kerr DA: Viral-induced spinal motor neuron death is non-cell-autonomous and involves glutamate excitotoxicity. *J. Neurosci.*, 24: 7566-7575, 2004.
- 23) Kuner R, Groom AJ, Bresink I, Kornau HC, Stefovskaya 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. U.S.A.*, 102: 5826-5831, 2005.
- 24) 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.
- 25) Kwak S, Kawahara Y: Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Mol. Med.*, 83: 110-120, 2005.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) Spalloni A, Albo F, Ferrari F, Mercuri N, Bernardi G, Zona C, Longone P: Cu/Zn-superoxide dismutase (GLY93 \rightarrow 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.
- 31) 郭伸: 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. *神経研究の進歩*, 50: 902-911, 2006.
- 32) Anzai T, Tsuzuki K, Yamada N, Hayashi T, Iwakuma M, Inada K, Kameyama K, Hoka S, Saji M: Overexpression of Ca^{2+} -permeable AMPA receptor promotes delayed cell death of hippocampal CA1 neurons following transient forebrain ischemia. *Neurosci. Res.*, 46: 41-51, 2003.
- 33) Liu S, Lau L, Wei J, Zhu D, Zou S, Sun HS, Fu Y, Liu F, Lu Y: Expression of Ca^{2+} -permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia. *Neuron*, 43: 43-55, 2004.

- 34) Noh KM, Yokota H, Mashiko T, Castillo PE, Zukin RS, Bennett MV: Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 12230-12235, 2005.
- 35) Calderone A, Jover T, Mashiko T, Noh KM, Tanaka H, Bennett MV, Zukin RS: Late calcium EDTA rescues hippocampal CA1 neurons from global ischemia-induced death. *J. Neurosci.*, 24: 9903-9913, 2004.
- 36) 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.

3. 筋萎縮性側索硬化症の AMPA 受容体仮説

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 日出山拓人
同 神経内科学准教授 郭 伸

key words ALS, AMPA receptor, GluR2, ADAR2, RNA editing

要 旨

我々のグループは、孤発性ALS脊髄運動ニューロンでは、グルタミン酸受容体であるAMPA (α -3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) 受容体サブユニットの一つであるGluR2のQ/R部位にRNA編集が起こらない未編集型のGluR2増加が、疾患特異的、細胞選択的に起こっていることを見だし、この分子変化がチャンネルのCa²⁺透過性亢進を通じて神経細胞死の直接原因になり、しかも変異SOD1関連家族性ALSを含めた他の神経変性疾患にはみられないことから、孤発性ALSの病因と考えられることを明らかにした¹⁾。私たちのグループの仮説の詳細は別稿を参照されたい^{2,3)}。本稿では、ALSのAMPA受容体仮説に至るまでの歴史的な経緯と背景を紹介する。機能分子の異常が細胞死と直結している点でこの仮説を証明することが、病因の解明のみならず特異的治療への道を切りひらく可能性があると考えている。

動 向

ALSは、1870年代にJean-Martin Charcotにより疾患概念が確立してから約140年となるが、今なお原因不明で運動ニューロンだけがある時期からなぜ突然死ぬのか、という機序は依然として

解明されていない。孤発性ALSは全患者の90%以上を占め、中毒説（農薬、鉛、水銀、アルミニウム、ALSと病態の似ている南アジアや東アフリカの地方病neurolethylismとの関連が疑われているエジプト豆に含有される β -N-oxalylamino-L-alanine: BOAA、グアム島のALS PD dementia complexの原因とされたソテツ中のアミノ酸 β -N-methylamino-L-alanine: BMAAなど）、神経栄養因子欠乏説、細胞骨格タンパク異常説、逆行性軸索流異常説 (dynein/dynactin) などが検討されてきたが、いずれも証明されていない。最も有力な仮説は、グルタミン酸受容体サブタイプであるAMPA受容体を介した興奮性神経細胞死仮説であり、中でも我々が見いだした孤発性ALS運動ニューロン選択的に生じているAMPA受容体のGluRサブユニットmRNAのRNA編集異常は、高い疾患特異性をもち、かつ神経細胞死の一次原因であることから孤発性ALSの病因と密接に関連すると考えられ、これを支持する知見が積み重ねられ現在に至っている。

A. 興奮性神経細胞死とは？

錐体路はグルタミン酸が神経伝達物質であり、脊髄運動ニューロンもこの興奮性入力を豊富に受