

図2 単一神経細胞におけるGluR2 Q/R部位RNA編集率

私たちが2004年にNature誌の発表した論文からの改題引用です。各点(大きな点は5細胞, 小さな点は1細胞)は, ALS群5例(A1-A5), コントロール群5例(C1-C5)の単一脊髄運動ニューロンにおけるGluR2 Q/R部位のRNA編集率と, ALS群2例(A2, A5), 多系統萎縮症(MSA)群2例(M1, M2), Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)群2例(D1, D2), コントロール群2例(C1, C2)の単一小脳プルキンエ細胞の編集率を表しています。平均値±標準誤差と解析した細胞数(n)も示してあります。運動ニューロンにおける正常コントロール76個の内訳は, C1; 28, C2; 12, C3; 13, C4; 12, C5; 11です。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において, 例外なく編集率は100%でしたが, ALS群では, 解析した5ケースすべてにおいて, 編集率は0%から100%まで大きくばらつき, 正常コントロール群と比較し, 有意に低下しておりました(Mann-Whitney U test, $p < 0.001$)。一方, 小脳プルキンエ細胞における編集率については, ALS群, MSA群, DRPLA群とコントロール群の間には有意差はありません(Mann-Whitney U test, $p > 0.05$)。

ルによく保たれていました。さらに孤発性ALS以外の運動ニューロン疾患で同じような分子変化が生じていないことを家族性ALS(ALS1)のモデル動物SOD1トランスジェニックラットの脊髄前角ニューロンで検討しました。その結果、発症したラットの脊髄運動ニューロンのGluR2 Q/R部位の編集率は全て正常ラットと変わらず100%に保たれており、孤発性ALSとは異なりGluR2 Q/R部位の異常が神経細胞死に関わっていないことを明らかにしました。

これは、前述したようにCa²⁺を通すAMPA受容体には未編集型GluR2が増加する場合と編集型GluR2が相対的に減ってしまう場合があり、前者が孤発性ALSに認められる分子変化であり、後者がSOD1トランスジェニックラットの細胞死に関わっていると考えられます。

さらにポリグルタミン病である球脊髄性筋萎縮症の脊髄前角ニューロンで同様の方法によって脊髄運動ニューロンのGluR2 Q/R部位の編集率を検討した結果、検索した運動ニューロン全てで編集率は100%に保たれていました。これは以前検討した同じポリグルタミン病の歯状核ルイ体淡蒼球萎縮症の小脳プルキンエ細胞における編集率も100%であったことも合わせて考えますとポリグルタミン病と言われる病気とは神経細胞死のメカニズムが違うということも分かりました。

以上の実験結果から、孤発性ALS脊髄運動ニューロンで認められたRNA編集異常は、脊髄の運動ニューロン特異的に起こる細胞選択的かつ他の疾患には見られない孤発性ALSにのみ見られる疾患特異的な分子変化であり、神経細胞死に直接関わっている可能性が高いと考えられます。

したがって、孤発性ALSの治療法としては孤発性ALSに特異的な発症メカニズムを正常化する方法の開発が必須であり、他の運動ニューロン疾患モデルを用いた治療効果判定には限界があることを示しています。このことを踏まえ、私たちは孤発性ALSの動物モデルを開発し、治療判定効果に役立てようと考えています。

おわりに

上記のように孤発性ALSの疾患病態と直接関わっていると考えられる分子異常が見つかり、発症メカニズムに基づいた分子標的治療法を確立できる可能性が少しずつ見えてきました。

運動ニューロン選択的に生じているGluR2 Q/R部位のRNA編集異常を回復できれば、ALSの治療へとつながるものと考えられます。検討課題はまだ多いのですが、これらが治療に結びつけられるように努力をしていきたいと考えています。



ALS と興奮性アミノ酸

ALS and Excitatory Amino Acid

相澤 仁志¹⁾ 郭 伸²⁾Hitoshi Aizawa¹⁾, Shin Kwak²⁾

Abstract

AMPA receptor, one of ionotropic glutamate receptors, has been proposed to play a critical role to initiate the neuronal death cascade in motor neuron disease by an increase of Ca^{2+} influx. There are at least two mechanisms to increase Ca^{2+} influx through Ca^{2+} -permeable AMPA receptor: a decrease of RNA editing efficacy at the GluR2 Q/R site and a decrease of GluR2 level relative to AMPA receptor subunits. Deficient RNA editing of the AMPA receptor subunit GluR2 at the Q/R site is a primary cause of neuronal death and recently has been reported to be a tightly linked etiological cause of motor neuron death in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS). On the other hand, relative low GluR2 level among AMPA receptor subunits seems to increase Ca^{2+} permeability of motor neurons in familial ALS (ALS1) linked to mutated copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1). 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). From the molecular pathomechanism of sporadic ALS and ALS1, drugs which increase RNA editing efficacy at the GluR2 Q/R site could be a potent therapy for sporadic ALS, while AMPA receptor antagonists could prevent deterioration from ALS1.

Key words : ALS, AMPA receptor, GluR2, RNA editing, ADAR2

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : 以下, ALS) は運動ニューロン疾患のなかで最も多く, 上位運動ニューロンと下位運動ニューロンが選択的に変性脱落する疾患である。多くは中年期に発症し, 進行性の筋萎縮と脱力をきたす。ALS の有病率は 10 万人あたり 0.8~7.3 人で, ほとんどは孤発性である。ALS のわずか 5~10% が家族性で, 複数の原因遺伝子 (SOD1, ALS1, sentaxin) が知られているが¹⁻⁴⁾, 家族性 ALS の運動ニューロン死のメカニズムは解明されていない。これに対して ALS の大多数を占める孤発性 ALS では, 剖検例での検討で, 残存脊髄運動ニューロンには, AMPA 受容体の Ca^{2+} 非透過性を決定づける編集型 GluR2 が減少していることが明らかにされ, Ca^{2+} の過剰な細胞内へ

の流入が, 運動ニューロン死の引き金になるという納得のゆく説明ができるようになった^{5,6)}。ALS では興奮性アミノ酸受容体の 1 つである AMPA 受容体の分子変化が, 中心的な役割を果たしていることが明らかとなってきたので, ここでは AMPA 受容体について述べることにする。最初に AMPA 受容体の特徴, 次に ALS をはじめとした運動ニューロン病の病態に関わる AMPA 受容体の役割, 最後に ALS の治療の展望について述べる。

I. AMPA 受容体と遅発性運動ニューロン死

錐体路はグルタミン酸を神経伝達物質としており, 脊髄運動ニューロンにはグルタミン酸受容体が高密度に存在し, 上位運動ニューロンから興奮性入力を受けている。生理的状态では上位運動ニューロンのシナプス終末からグルタミン酸が放出され, 脊髄運動ニューロンの受容体

- 1) 旭川医科大学神経内科 [〒078-8510 旭川市緑が丘東 2 条 1-1-1] Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Asahikawa Medical College, 2-1-1-1 Midorigaoka-higashi, Asahikawa 078-8510, Japan
- 2) 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 Department of Neurology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

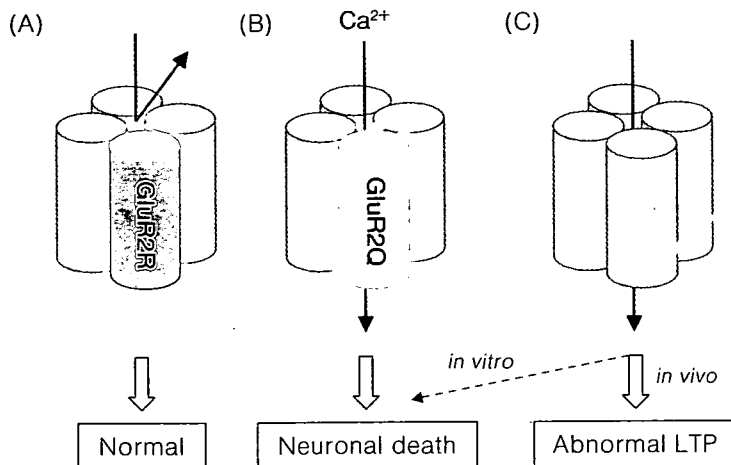


Fig. 1 AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性と GluR2 サブユニット

AMPA 受容体はグルタミン受容体サブユニットで構成される 4 量体であり、4 種類のサブユニットである GluR1, GluR2, GluR3, GluR4 のさまざまな組み合わせがあり得る。AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性は、構成する受容体サブユニットによって異なる。AMPA 受容体に少なくとも 1 つの GluR2 サブユニットがなければ、 Ca^{2+} 透過性が高く (C)、また GluR2 サブユニットがあっても Q/R 部位が未編集 (GluR2Q) であれば Ca^{2+} 透過性が高い (B)。これに対して編集された GluR2 サブユニット (GluR2R) を有している AMPA 受容体は Ca^{2+} 透過性が低い (A)。ALS での運動神経細胞死の病態に GluR2 サブユニットの Q/R 部位の編集率の低下が関与している。*In vitro* では GluR2R を持たない Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体が、小脳神経細胞の細胞死に関与することが知られている。また GluR2 ノックアウトマウスでは電気生理学的な検討で、長期増強効果 (long-term potentiation: LTP) の亢進を認めている (文献 61) Kwak S & Kawahara Y, 2005 より引用改変)。

に結合し、その後、アストロサイトに存在するグルタミン酸トランスポーターによって取り込まれ、シナプス間隙のグルタミン酸は一定の濃度に保たれる。シナプス間隙のグルタミン酸濃度が過度になると、ニューロンが過興奮し、細胞内への異常な Ca^{2+} 流入により、細胞内環境の変化を引き起こし、ニューロン死に陥る。これがいわゆる興奮性ニューロン死であり、虚血や低血糖、外傷、てんかん重積発作などにおける急性のニューロン死のメカニズムと考えられている⁷⁾。一方、ALS のような緩徐進行性の神経変性疾患にも、グルタミン酸を介した遅発性興奮性ニューロン死が関与していることが示されてきた⁸⁾。この遅発性のニューロン死のメカニズムにはグルタミン酸受容体の中で、特に AMPA 受容体が重要な役割をしていることが徐々に明らかにされてきた。

1. AMPA 受容体と Ca^{2+} 透過性

グルタミン酸受容体はイオンチャネル型と代謝調節型に分けられ、AMPA 受容体はイオンチャネル型受容体の 1 つである。AMPA 受容体は GluR1 と GluR2,

GluR3, GluR4 の 4 種類のサブユニットのさまざまな組み合わせで構成される 4 量体である。グルタミン酸受容体、AMPA 受容体の全般については、他の総説を参照されたい⁸⁻¹²⁾。AMPA 受容体を構成するサブユニットに GluR2 が含まれているかどうかで、AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性は非常に異なる。AMPA 受容体サブユニットに少なくとも 1 つの GluR2 があれば、 Ca^{2+} 透過性が低く、GluR2 がなければ Ca^{2+} 透過性が高くなる¹³⁻¹⁶⁾ (Fig. 1)。GluR2 の発現のない GluR2-null マウスの海馬培養細胞では AMPA 受容体を介した細胞死が引き起こされるが¹⁷⁾、GluR2 のノックアウトマウスでは長期増強効果 (long-term potentiation: LTP) 亢進を起こすものの、細胞死を引き起こさない¹⁸⁾ (Fig. 1)。

この GluR2 の Ca^{2+} 非透過性は、膜ドメイン M2 に存在する Q/R 部位が、転写後にグルタミン (Q) からアルギニン (R) に RNA 編集されることによって獲得される^{14,19,20)}。マウスやラット、ヒト脳の GluR2 mRNA は、ほとんどが Q/R 部位ではアルギニン (R) であるのに対して、GluR1, GluR3, GluR4 では同部位でグルタミン

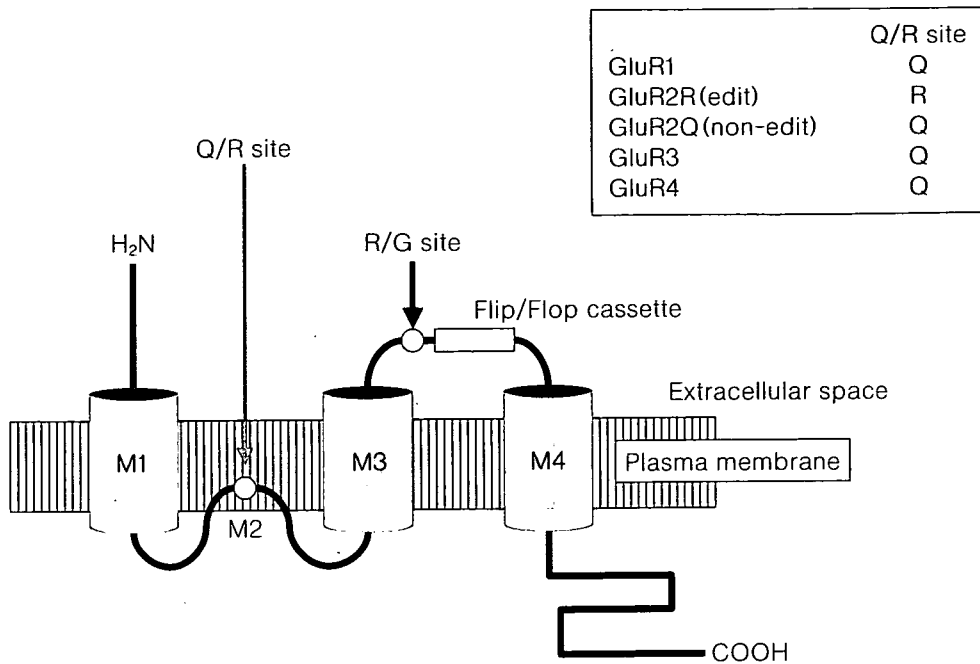


Fig. 2 AMPA 受容体サブユニットの構造

AMPA 受容体サブユニットには M1, M3, M4 の膜貫通部分があり, 各サブユニットには選択的スプライシングにより, Flip 型あるいは Flop 型のアミノ酸配列を細胞外に持つ。GluR2, GluR3, GluR4 には RNA 編集を受ける R/G 部位があり, アルギニン (R) からグリシン (G) へ置換する。R/G 部位は受容体脱感作を修飾すると考えられている。M1 と M3 の間には膜内に M2 が存在する。この間に Q/R 部位が存在する。GluR2 サブユニットの Q/R 部位では, 翻訳過程でグルタミン (Q) がアルギニン (R) に編集される (文献 61) Kwak S & Kawahara Y, 2005 より引用改変)。

(Q) のままである (Fig. 2)。AMPA 受容体は編集型 GluR2 (GluR2R) を持てば Ca^{2+} 非透過性なのに対して, 未編集型 GluR2 (GluR2Q) であれば Ca^{2+} 透過性である^{21,22)}(Fig. 1)。GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が細胞死に影響することが, 変異マウスにより証明されている。すなわち GluR2 Q/R 部位で RNA 編集されない変異マウスは, 痙攣重積に伴い神経細胞死をきたして, 生後 20 日以内に死亡する²³⁾。また, 遺伝子導入により GluR2R を減少させ, Ca^{2+} 透過性を上昇させたマウスで, 遅発性運動ニューロン死をきたすことも知られている²⁴⁾。さらに GluR2R を含まない AMPA 受容体のみを発現する培養小脳 Purkinje 細胞では, Ca^{2+} 透過性ととも細胞死をきたすことが示されている。

AMPA 受容体の Ca^{2+} influx は, GluR2 サブユニットとその GluR2 Q/R 部位の編集率が重要であるが, そのほかにも開口したチャネル数や flip/flop splicing variant, AMPA 受容体の細胞表面密度などが関与すると考えられる。

2. GluR2 Q/R 部位の RNA 編集

RNA 編集は転写後に mRNA が塩基の修飾を受ける仕組みの 1 つで, 遺伝子特異的コドンを変化することにより, 蛋白の構造や機能を変化させ得るものである^{25,26)}。哺乳類では, RNA 編集は主にアデノシン (A) からイノシン (I) への変換 (A-to-I editing), シチジン (C) からウラシル (U) への変換 (C-to-U editing) が起こるとされている (Fig. 3)。中枢神経系では A-to-I editing が主に行われ, グルタミン酸受容体サブユニット²⁷⁻²⁹⁾, セロトニン受容体 $5\text{HT}_{2c}\text{R}$ ³⁰⁾, 電位依存性 K チャネル $\text{Kv}1.1$ ³¹⁾, RNA 編集酵素 ADAR2 などが知られている³²⁾。この中で, 特に ADAR2 によってなされる GluR2 Q/R 部位のアミノ酸の変化は, AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を変化させ^{13-15,21,22,28,33-35)}, チャネルの開口に関係している²⁹⁾。

GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は主に, adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) 2 と呼ばれる編集酵素によって行われる。RNA 編集酵素は哺乳類ではこれに加え ADAR1, ADAR3 の 3 種類が知られており³⁶⁻⁴¹⁾, ADAR1 と ADAR2 はほとんどの組織で発現し

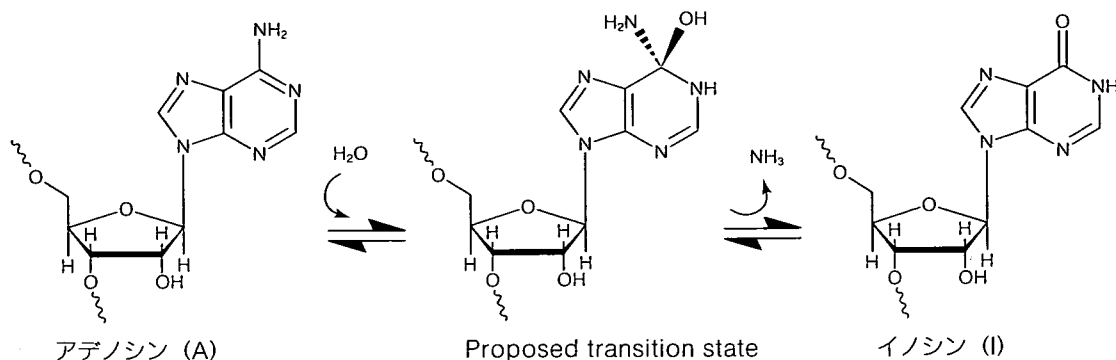


Fig. 3 GluR2 Q/R部位のRNA編集

アデノシン (A) がイノシン (I) に編集される。イノシンは翻訳過程でグアノシン (G) として翻訳され、アミノ酸レベルではグルタミン (CAG) からアルギニン (CGG) と変換される。

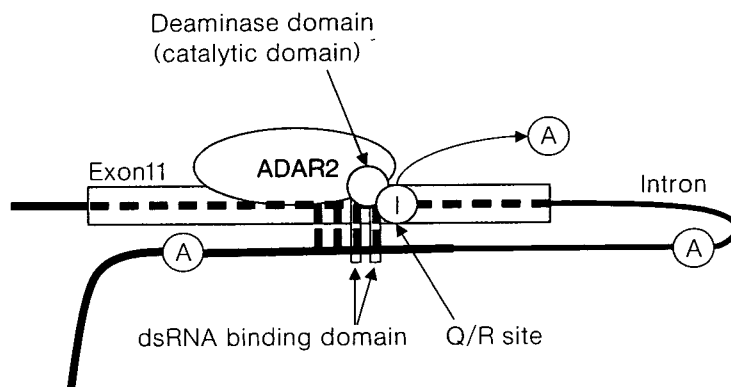


Fig. 4 Adenosine deaminases acting on RNA (ADAR) 2 と RNA 編集
GluR2 Q/R部位のRNA編集は、編集酵素である ADAR2 によって行われる。ADAR2 は 2つの double strand RNA-binding domain と catalytic domain を持ち、GluR2 mRNA exon11 の Q/R 部位のアデノシン残基 (A) を認識し、アデノシン (A) をイノシン (I) へ編集する。

ている^{36,38,42,43}。ADAR2 は編集酵素活性を持つ catalytic domain と、編集される部位にある 2 本鎖 RNA 結合部位 (double strand RNA binding domain) を有する (Fig. 4)。ADAR2 は主要な GluR2 Q/R 部位の RNA 編集酵素である。また ADAR1 と ADAR2 のいずれもカイン酸受容体のサブユニットである GluR5 と GluR6 の Q/R 部位の編集にも関わる^{44,45}。GluR2 はげっ歯類の neonate の白質や adult の脳ではほとんど完全に編集されている^{15,46-48}。ヒト脳 mRNA では、白質も含め必ずしも完全には Q/R 部位は編集されていない^{5,49-55}。脳の各部位の単一ニューロンレベルでは 100% 編集されているが、成人の白質では編集率が低下している^{52,53}。したがって、ヒト脳のグリア細胞では生理的状態で Ca^{2+} 透過性の AMPA 受容体を発現しているようである。実際、オリゴデンドロサイトは GluR2Q を発現しており、アストロサイトと小脳の Bergmann グリア細胞では、

GluR2R の発現がみられない^{19,56,57}。このように、ヒト脳では部位特異的、細胞特異的に GluR2 Q/R 部位の編集が制御されている可能性がある。

3. AMPA 受容体サブユニットの膜への輸送機構

AMPA 受容体サブユニットは細胞内小胞体にプールされ、さまざまな組み合わせで 2 量体同士の会合によって 4 量体を形成し、細胞膜へ輸送され機能的な AMPA 受容体を構成する⁵⁸。GluR2 を含む AMPA 受容体は、含まない受容体と比べ、膜表面に輸送されにくい。さらに未編集型の GluR2Q と編集型の GluR2R が同時に存在すると、GluR2Q が他のサブユニットと複合体を形成して、効率よく膜表面に輸送される。これに対して、GluR2Q が存在すると、GluR2R は小胞体にとどまり、膜へ輸送されにくくなる⁵⁸。すなわち、GluR2Q が比較的少なくても、より膜表面へ輸送されやすく、AMPA 受容体

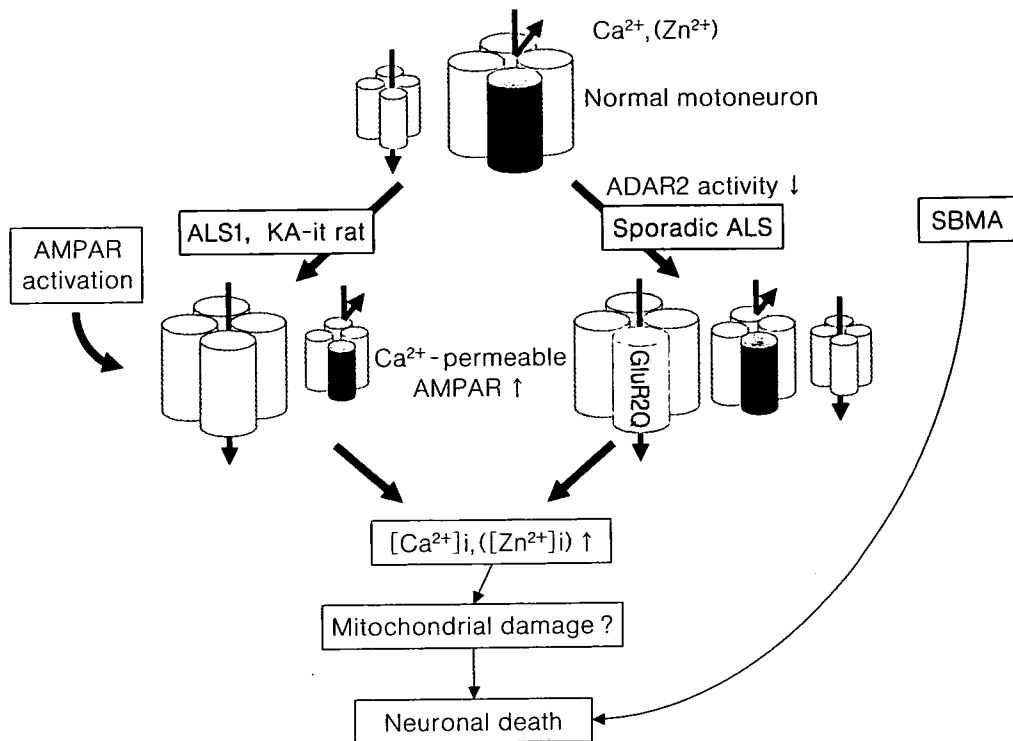


Fig. 5 AMPA 受容体を介する運動神経細胞死の分子機構

正常の脊髄運動神経細胞の AMPA 受容体は、ほとんどが編集型 GluR2 (GluR2R) を含み、 Ca^{2+} 非透過性である。孤発性 ALS と変異 SOD1 関連家族性 ALS (ALS1) のいずれも、AMPA 受容体を介した Ca^{2+} 透過性亢進により、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇して神経細胞死をきたすと考えられるが、その機序は異なっている。孤発性 ALS では、脊髄運動神経細胞において未編集型 GluR2 (GluR2Q) を含む AMPA 受容体が増え、細胞死に至ると考えられる。ALS1 では GluR2 を含む AMPA 受容体の割合が増えることに加え、変異 SOD1 の細胞毒性などの因子が加わり、細胞死に陥ると考えられる。球脊髄性筋萎縮症 (spinal and bulbar muscular atrophy: SBMA) の運動神経細胞死には、AMPA 受容体を介する機序は関与していない (文献 70) 郭 伸, 2006, 文献 77) Kwak S & Weiss JH, 2006 より引用改変)。

の Ca^{2+} 透過性が亢進し、ニューロン死を引き起こし得ると考えられる^{9,11)}。今のところ、ALS における GluR2 の輸送機構異常の有無に関する報告はみられていない。

II. 運動ニューロン疾患における神経細胞死のメカニズム

1. 孤発性 ALS

ALS の大部分を占める孤発性 ALS では、まず凍結脊髄前角組織レベルで部位選択的、疾患特異的に GluR2 Q/R 部位の mRNA 編集率低下が明らかにされた⁵⁾。さらに単一脊髄運動ニューロンレベルで、GluR2 mRNA 発現量に有意な減少がないにもかかわらず⁵⁹⁾、GluR2 Q/R 部位の未編集型が増加していることが明らかにされた⁶⁾。正常対照群の運動ニューロンでは、全例で GluR2 Q/R 部位の RNA は 100% 編集されていたが、ALS 群では 100% のものから 0%、その中間のものとはばらつ

て、平均すると 38.75% であった。これに対して ALS 群の小脳プルキンエ細胞の GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率は、正常対照群と同様にほぼ 100% であった。また多系統萎縮症や歯状核赤核淡蒼球レイ体萎縮症の小脳プルキンエ細胞でもほぼ 100% であった。孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンで明らかにされた RNA 編集率の低下は、疾患特異的、細胞選択的变化であり、孤発性 ALS の運動ニューロン死に直接関わっていると考えられる^{9-11,12,60-62)}。脊髄運動ニューロンには GluR2 サブユニットの割合が少なく、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の割合が多いことが⁵³⁾、脊髄運動ニューロンの RNA 編集率低下に対する脆弱性と関連しているとも考えられる (Fig. 5)。

2. 変異 SOD1 関連家族性 ALS (ALS1)

ALS1 では、今のところヒトでの検討はなされていないが、AMPA 受容体を介する神経細胞死が関与して

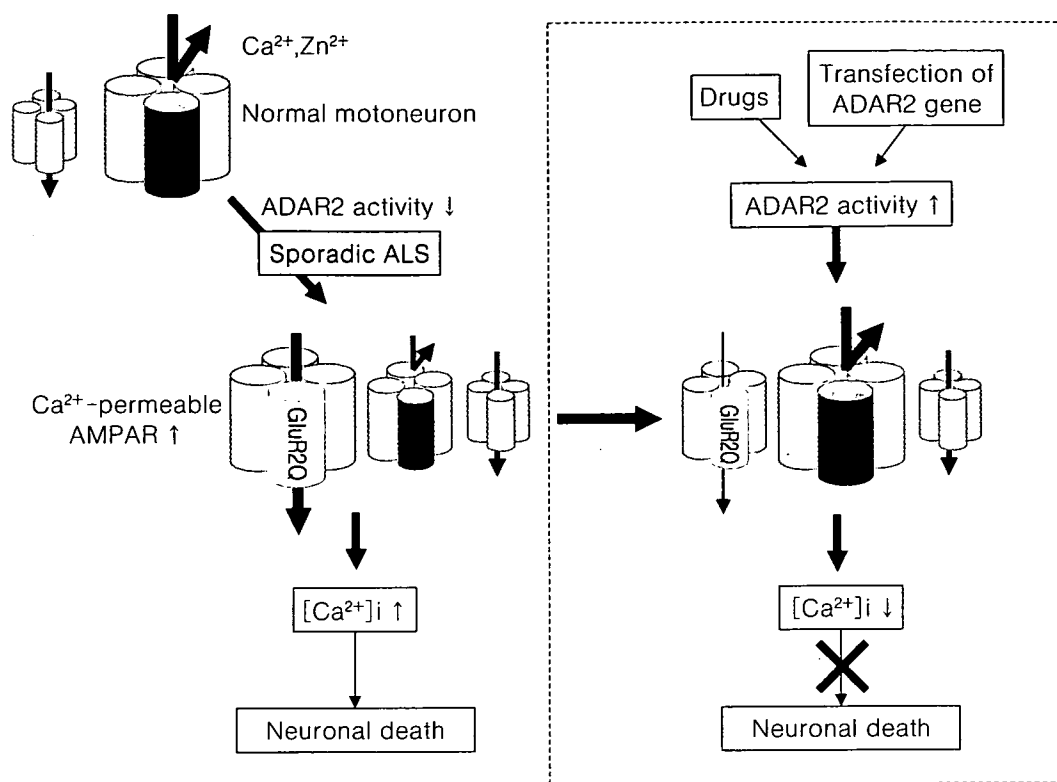


Fig. 6 孤発性 ALS の ADAR2 を標的とした治療戦略

孤発性 ALS では ADAR2 活性の低下により、脊髄運動神経細胞の未編集型 GluR2 (GluR2Q) を含む AMPA 受容体が増え、 Ca^{2+} 透過性が増加して、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を契機に細胞死へのカスケードが進むと考えられる。したがって、ADAR2 活性を回復することが孤発性 ALS の治療となり得ると考えられる。方法としては ADAR2 活性を上昇させる薬剤の発見、開発である。その他に活性型の ADAR2 の遺伝子導入も治療法としての可能性がある (文献 70) 郭 伸, 2006 より引用改変)。

いる可能性を示唆する知見が、モデル動物を用いて得られている。In vitro では、GluR2 欠損マウスの胎児から得られた運動ニューロンの培養細胞は、AMPA 受容体を介した Ca^{2+} 透過性が亢進し、カイン酸に対する毒性が増加する。変異 SOD1 トランスジェニックマウスに、この GluR2 欠損マウスを掛け合わせると、in vivo では早期に運動ニューロンが脱落変性する⁶³⁾。また GluR2 の過剰発現では、変異 SOD1 トランスジェニックマウスの延命効果を認めている⁶⁴⁾。さらに、GluR2 Q/R 部位をアスパラギンに置換し、GluR2R を約 76% に減少したモデルでは、遅発性運動ニューロン死をきたすが、このモデルを変異 SOD1 トランスジェニックマウスに掛け合わせると、運動ニューロン死が促進される²⁴⁾。変異 SOD1 による運動ニューロン死には GluR2 Q/R 部位の RNA 編集はみられないことから⁶⁵⁾、ALS1 では GluR2 の発現の増減が運動ニューロン死の修飾因子となり得ると考えられる。

変異 SOD1 トランスジェニックマウスの運動ニューロンでは、カイン酸毒性に対してより脆弱で、かつ

GluR3 と GluR4 mRNA の増加がみられるとの報告や⁶⁶⁾、別の報告では GluR2 サブユニットの減少と GluR3 mRNA の発現上昇が報告されている⁶⁷⁾。さらに、変異 SOD1 トランスジェニックマウスに GluR3 に対するアンチセンス mRNA を髄腔内に投与すると、腰髄 GluR3 を蛋白レベルでは検出できないものの、延命効果を認めている⁶⁸⁾。興味深いことに、カイン酸髄注 ALS モデルラットでも GluR3 mRNA の上昇がみられている⁶⁹⁾。この ALS モデルラットでは、低容量のカイン酸を慢性持続投与することにより、運動ニューロンのみが選択的に遅発性的変性脱落をきたすが、運動ニューロンのみで GluR3 mRNA の発現上昇がみられる。GluR2 を含め、他の AMPA 受容体サブユニットの発現量には変化がみられない。この変化は AMPA 受容体アンタゴニストで阻止される。また GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常もみられない。したがって、このモデルの運動ニューロン死には AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性亢進が関わっているものの、GluR2 の減少や GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常では説明がつかない。GluR3 サブユニットが増

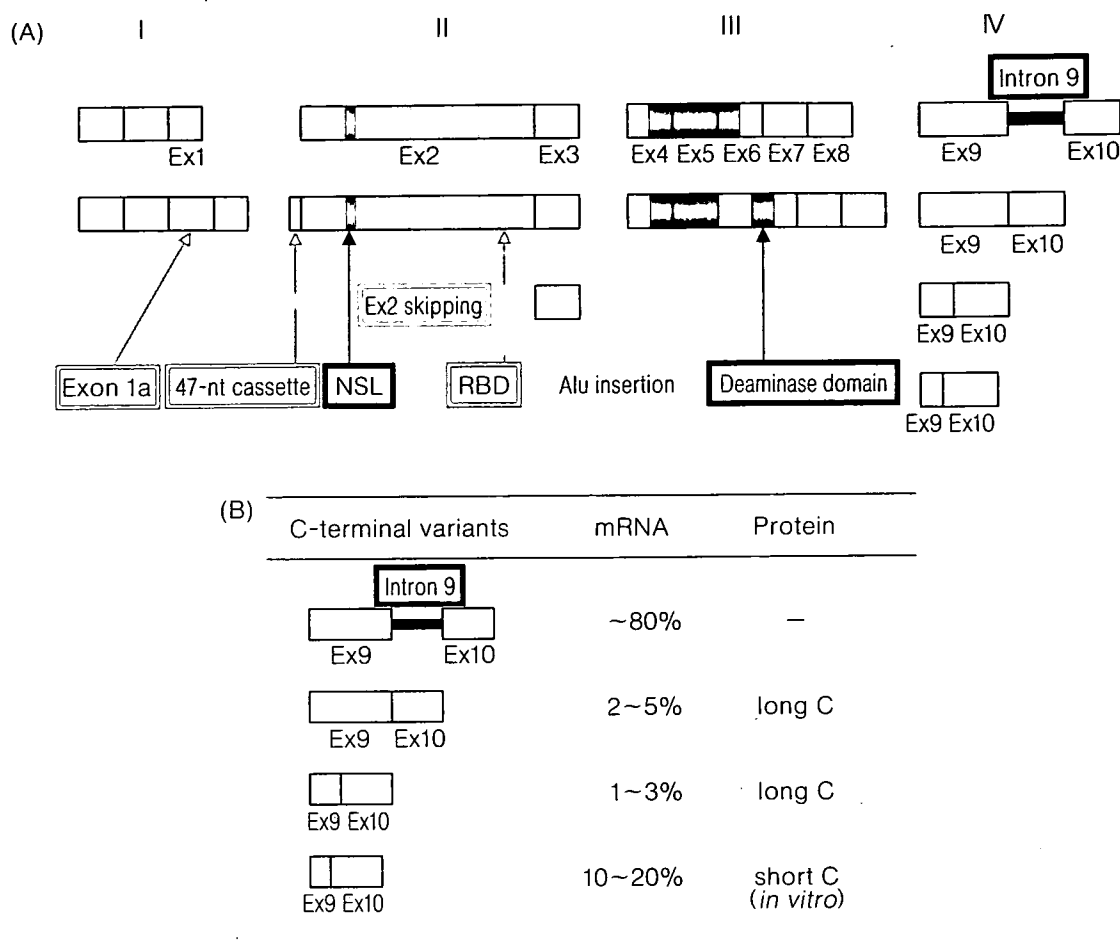


Fig. 7A ヒト脳の ADAR2 (A : ADAR2 mRNA variant, B : C-terminal variant)

A : ヒト脳の ADAR2 mRNA には 4 ドメインがあり、それぞれのドメインに variant が存在する。第 I ドメインには exon 1a を含むものと含まないものの 2 種類がある。第 II ドメインには 47 ヌクレオチドカセットを含むものと、含まないもの、さらに exon 2 を欠くものの 3 種類がある。第 III ドメインには Alu 配列を含むものと含まないものの 2 種類が存在する。第 IV ドメインには 4 種類 (intron 9 retention のあるもの、全長 exon 9、短縮型 exon 9 の 2 種類) の variant が存在する。これらのドメインはそれぞれスプライシングを受けるので、 $2 \times 3 \times 2 \times 4 = 48$ 種類の mRNA variant が存在する可能性がある。B : 第 IV ドメインの variant の mRNA 量は intron 9 retention type が最も多いが、蛋白に翻訳されず、その機能も明らかでない。また短縮型 exon 9 をもつ mRNA も蛋白に翻訳されない。したがって、翻訳される第 IV ドメインを持つ mRNA は全体のわずか 3 ~ 8% にすぎない (文献 65) Kawahara et al, 2005, 文献 70) 郭 伸, 2006 より引用改変)。

加することにより、相対的に GluR2 サブユニットの AMPA 受容体に占める割合が減少し、GluR2 を含まない Ca^{2+} 透過性の AMPA 受容体が増加することが、このモデルでの運動ニューロン変性メカニズムと考えられる^{69,70)}。この GluR3 の変化は前述した変異 SOD1 トランスジェニックマウスでみられるものと同様で、ALS1 では AMPA 受容体が持続的に刺激され、GluR3 mRNA の発現が上昇している可能性があると考えられる (Fig. 5)。

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

SBMA はアンドロゲン受容体遺伝子エクソン 1 の CAG リピートが、正常の約 2 倍に異常伸長するポリグルタミン病で、下位運動ニューロンの変性をきたす疾患である。臨床的には、ALS に比べて臨床経過が非常に長い。剖検 SBMA3 症例の残存脊髄運動ニューロン 44 個の検討では、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は 100% であり⁶⁵⁾、SBMA では RNA 編集異常が神経細胞死に関与している可能性は低いようである。また、歯状核ルイ体淡蒼球萎縮症プルキンエ細胞でも、GluR2 Q/R 部位の

RNA 編集に異常がなく⁶⁾, ハンチントン病疾患モデルでは AMPA 受容体感受性は不変⁷¹⁻⁷⁴⁾, あるいは低下していることから, 今のところポリグルタミン病における神経細胞死には, AMPA 受容体が関与しているという証拠は得られていない (Fig. 5)。

III. 孤発性 ALS, 変異 SOD1 関連 ALS (ALS1) の病態を標的とした特異的治療法

1. 孤発性 ALS (Fig. 6)

現在まで孤発性 ALS の治療薬としては, グルタミン酸拮抗薬であるリルゾールが唯一使用可能であるが, 効果に乏しく, 満足のいく治療法とは言いがたい。新たな治療法として, 今まで明らかにされた孤発性 ALS の分子病態をターゲットとして, 運動ニューロンの ADAR2 活性を回復することが, 有力な治療法となり得ると考えられる。その方法の 1 つは, ADAR2 活性を上昇させる薬剤を見出すことである。筆者らは培養細胞を用い, 各種薬剤をスクリーニングし, 複数の薬剤が ADAR2 活性を上昇させることを見出した⁷⁵⁾。ADAR2 活性の回復は, GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率を正常化することを意味しており, AMPA 受容体を介する過剰な Ca^{2+} 透過性を正常化し, 最終的には ALS の運動ニューロン死を阻止しようと考えられる。

また, ADAR2 活性を有する遺伝子導入も, 可能性のある治療法と考えられる。一過性の脳虚血では海馬 CA1 錐体細胞で ADAR2 mRNA の発現が低下し, GluR2 Q/R 部位の編集低下が起こり, 遅発性の細胞死が起こるが, ADAR2 の遺伝子導入により細胞死を回避できると報告されている⁷⁶⁾。一般的に, 一過性脳虚血後の海馬 CA1 の遅発性選択的神経細胞死では, GluR2 mRNA の発現低下のためとされていたが⁷⁷⁾, ALS と同様な GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常がそのメカニズムであることが明らかになった。遺伝子導入は魅力的な治療法であるが, 孤発性 ALS の ADAR2 活性低下の原因を明らかにするために, ADAR2 活性調節機構を解明することが本質的な治療につながると思われる。

ADAR2 mRNA には splicing variant が 48 種類あるが⁷⁸⁾ (Fig. 7 A), ヒト小脳組織での検討では, ADAR2 蛋白として同定できるのは 2 種類の翻訳型 variant で⁷⁸⁾, いずれも ADAR2 活性を持つ。しかし, 生理的狀態では ADAR2 の翻訳型 variant (蛋白レベルで long C を持つ: Fig. 7 B) の割合は極めて少なく, せいぜい 2.8% である。イントロン 9 retention タイプの variant は, ADAR2 mRNA 発現量の 80% にも及ぶが, 非翻訳型で

ありその生物学的意味付けは, 細胞環境の変化に伴い翻訳型 variant 非翻訳型を産生するためとする考えがある⁷⁹⁾。この考えが正しいとすると, 大量に存在するイントロン 9 retention タイプの ADAR2 mRNA splicing variant が, ADAR2 活性を有する翻訳型に変換するようなメカニズムが解明されれば, 孤発性 ALS の新たな特異的治療法につながる可能性がある。

2. 変異 SOD1 関連 ALS (ALS1)

ALS1 では, AMPA 受容体を介した Ca^{2+} 透過性亢進が運動ニューロン死を促進していると考えられるので, 慢性的な AMPA 受容体刺激をブロックする拮抗薬がその候補となり, カイニン酸髄注ラットでもこれを支持する所見が得られている。また, Ca^{2+} 透過性を低下させるために AMPA 受容体を構成する編集型 GluR2 を増加させることが, 運動ニューロン死を遅延させる治療となりうる。

おわりに

ALS は長い間, 原因不明で治療法に乏しく, ケアが中心の神経変性疾患であった。患者は末期に至るまで, 意識は清明で, 知能・感覚は保たれ, 運動機能障害により日常生活全面に介護を要し, 本人のみならず家族の負担は心身ともに多大である。ALS の病因が明らかにされ, 一日でも早く特異的治療法が確立され, 患者および家族への福音となることが望まれる。

謝辞

この研究は, 文部科学省科学研究費, 厚生科学研究費などの援助を受けて行った。

文献

- 1) Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, et al: Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62, 1993
- 2) Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, et al: A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29: 166-173, 2001
- 3) Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabagh O, Sasaki T, et al: The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 29: 160-165, 2001
- 4) Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, et

- al: DNA/RNA Helicase Gene Mutations in a Form of Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet* **74**: 1128-1135, 2004
- 5) 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
 - 6) 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
 - 7) Rothman SM, Olney JW: Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* **19**: 105-111, 1986
 - 8) 相澤仁志, 中村良司, 郭 伸: 実験的遅発性興奮性運動ニューロン死. *Clin Neurosci* **16**: 896-900, 1998
 - 9) 日出山拓人, 河原行郎, 郭 伸: ALSとAMPA受容体. *No To Shinkei* **57**: 585-598, 2005
 - 10) Kawahara Y and 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
 - 11) 日出山拓人, 河原行郎, 郭 伸: 筋萎縮性側索硬化症の分子病理—病態と治療—. *最新医学* **60**: 1072-1080, 2005
 - 12) 日出山拓人, 河原行郎, 郭 伸: 筋萎縮性側索硬化症の研究の進歩. *医学のあゆみ* **212**: 2613-2620, 2005
 - 13) Hollmann M, Hartley M, Heinemann S: Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* **252**: 851-853, 1991
 - 14) Verdoorn T, Burnashev N, Monye rH, Seeburg P, Sakmann B: Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* **252**: 1715-1718, 1991
 - 15) Burnashev N, Khodorova A, Jonas P, Helm P, Wisden W, et al: Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science* **256**: 1566-1570, 1992
 - 16) Koh DS, Burnashev N, Jonas P: Block of native Ca (2+)-permeable AMPA receptors in rat brain by intracellular polyamines generates double rectification. *J Physiol* **486**: 305-312, 1995
 - 17) Iihara K, Joo DT, Henderson J, Sattler R, Taverna FA, et al: The influence of glutamate receptor 2 expression on excitotoxicity in Glur2 null mutant mice. *J Neurosci* **21**: 2224-39, 2001
 - 18) Jia Z, Agopyan N, Miu P, Xiong Z, Henderson J, et al: Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* **17**: 945-956, 1996
 - 19) Burnashev N, Monyer H, Seeburg P, Sakmann B: Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* **8**: 189-198, 1992
 - 20) Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF: Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* **253**: 1028-1031, 1991
 - 21) Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B: Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol* **485**: 403-418, 1995
 - 22) Swanson G, Kamboj S, Cull-Candy S: Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *J Neurosci* **17**: 58-69, 1997
 - 23) Brusa R, Zimmermann F, Koh D, Feldmeyer D, Gass P, et al: Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science* **270**: 1677-1680, 1995
 - 24) Kuner R, Groom AJ, Bresink I, Kornau HC, Stefovskaya V, et al: Late-onset motoneuron disease caused by a functionally modified AMPA receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5826-5831, 2005
 - 25) Gerber AP, Keller W: RNA editing by base deamination: more enzymes, more targets, new mysteries. *Trends Biochem Sci* **26**: 376-384, 2001
 - 26) Keegan LP, Gallo A, OConnell MA: The many roles of an RNA editor. *Nat Rev Genet* **2**: 869-878, 2001
 - 27) Sommer B, Köhler M, Sprengel R, Seeburg P: RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* **67**: 11-19, 1991
 - 28) Köhler M, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg P: Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron* **10**: 491-500, 1993
 - 29) Lomeli H, Mosbacher J, Melcher T, Hoger T, Geiger JR, et al: Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science* **266**: 1709-1713, 1994
 - 30) Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, et al: Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* **387**: 303-308, 1997
 - 31) Hoopengardner B, Bhalla T, Staber C, Reenan R: Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics. *Science* **301**: 832-836, 2003
 - 32) Rueter SM, Dawson TR, Emeson RB: Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature* **399**: 75-80, 1999
 - 33) Jonas P, Burnashev N: Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron* **15**: 987-990, 1995
 - 34) Puchalski R, Louis J, Brose N, Traynelis S, Egebjerg J, et al: Selective RNA editing and subunit assembly of native glutamate receptors. *Neuron* **13**: 131-147, 1994

- 35) Swanson GT, Feldmeyer D, Kaneda M, Cull-Candy SG: Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J Physiol (Lond)* **492**: 129-142, 1996
- 36) Kim U, Wang Y, Sanford T, Zeng Y, Nishikura K: Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11457-11461, 1994
- 37) O'Connell MA, Krause S, Higuchi M, Hsuan JJ, Totty NF, et al: Cloning of cDNAs encoding mammalian double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *Mol Cell Biol* **15**: 1389-1397, 1995
- 38) Melcher T, Maas S, Herb A, Sprengel R, Seeburg P, Higuchi M: A mammalian RNA editing enzyme. *Nature* **379**: 460-464, 1996
- 39) Melcher T, Maas S, Herb A, Sprengel R, Higuchi M, Seeburg PH: RED2, a brain-specific member of the RNA-specific adenosine deaminase family. *J Biol Chem* **271**: 31795-31798, 1996
- 40) O'Connell MA, Gerber A, Keller W: Purification of human double-stranded RNA-specific editase 1 (hRED1) involved in editing of brain glutamate receptor B pre-mRNA. *J Biol Chem* **272**: 473-478, 1997
- 41) Chen CX, Cho DS, Wang Q, Lai F, Carter KC, Nishikura K: A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains. *RNA* **6**: 755-767, 2000
- 42) Lai F, Chen C, Carter K, Nishikura K: Editing of glutamate receptor B subunit ion channel RNAs by four alternatively spliced DRADA2 double-stranded RNA adenosine deaminases. *Mol Cell Biol* **17**: 2413-2424, 1997
- 43) Gerber A, O'Connell M, Keller W: Two forms of human double-stranded RNA-specific editase 1 (hRED1) generated by the insertion of an Alu cassette. *RNA* **3**: 453-463, 1997
- 44) Wang Q, Khillan J, Gadue P, Nishikura K: Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. *Science* **290**: 1765-1768, 2000
- 45) Higuchi M, Maas S, Single FN, Hartner J, Rozov A, et al: Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* **406**: 78-81, 2000
- 46) Paschen W, Djuricic B: Regional differences in the extent of RNA editing of the glutamate receptor subunits GluR2 and GluR6 in rat brain. *J Neurosci Methods* **56**: 21-29, 1995
- 47) Carlson NG, Howard J, Gahring LC, Rogers SW: RNA editing (Q/R site) and flop/flip splicing of AMPA receptor transcripts in young and old brains. *Neurobiol Aging* **21**: 599-606, 2000
- 48) Seeburg PH: A-to-I editing: new and old sites, functions and speculations. *Neuron* **35**: 17-20, 2002
- 49) Akbarian S, Smith M, Jones E: Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimers disease, Huntingtons disease and schizophrenia. *Brain Res* **699**: 297-304, 1995
- 50) Paschen W, Hedreen J, Ross C: RNA editing of the glutamate receptor subunits GluR2 and GluR6 in human brain tissue. *J Neurochem* **63**: 1596-1602, 1994
- 51) Kamphuis W, Lopes da Silva F: Editing status at the Q/R site of glutamate receptor-A, -B, -5 and -6 subunit mRNA in the hippocampal kindling model of epilepsy. *Mol Brain Res* **29**: 35-42, 1995
- 52) 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, 2003
- 53) Kawahara Y, Ito K, Sun H, Ito M, Kanazawa I, Kwak S: Regulation of glutamate receptor RNA editing and ADAR mRNA expression in developing human normal and Down's syndrome brains. *Brain Res Dev Brain Res* **148**: 151-5, 2004
- 54) Maas S, Patt S, Schrey M, Rich A: Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14687-14692, 2001
- 55) Kortenbruck G, Berger E, Speckmann EJ, Musshoff U: RNA editing at the Q/R site for the glutamate receptor subunits GLUR2, GLUR5, and GLUR6 in hippocampus and temporal cortex from epileptic patients. *Neurobiol Dis* **8**: 459-468, 2001
- 56) Seifert G, Steinhauser C: Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca²⁺ permeability. *Eur J Neurosci* **7**: 1872-1881, 1995
- 57) Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, et al: Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* **15**: 193-204, 1995
- 58) Greger IH, Khatri L, Kong X, Ziff EB: AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* **40**: 763-774, 2003
- 59) Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, et al: Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: An implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* **85**: 680-689, 2003
- 60) 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
- 61) Kwak S, Kawahara Y: Deficient RNA editing of

- GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med* 83: 110-120, 2005
- 62) 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. *Clin Neurosci* 24: 222-225, 2006
- 63) Van Damme P, Braeken D, Callewaert G, Robberecht W, et al: GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 605-612, 2005
- 64) Tateno M, Sadakata H, Tanaka M, Itohara S, Shin RM, et al: 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
- 65) Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, et al: 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
- 66) Spalloni A, Albo F, Ferrari F, Mercuri N, Bernardi G, et al: 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: 340-50, 2004
- 67) Tortarolo M, Grignaschi G, Calvaresi N, Zennaro E, Spaltro G, et al: 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: 134-46, 2006
- 68) Rembach A, Turner BJ, Bruce S, Cheah IK, Scott RL, et al: Antisense peptide nucleic acid targeting GluR3 delays disease onset and progression in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J Neurosci Res* 77: 573-82, 2004
- 69) 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: 782-91, 2006
- 70) 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. *神経進歩* 50: 902-211, 2006
- 71) Levine MS, Klapstein GJ, Koppel A, Gruen E, Cepeda C, et al: Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 58: 515-32, 1999
- 72) Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, et al: Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 33: 849-60, 2002
- 73) Snider BJ, Moss JL, Revilla FJ, Lee CS, Wheeler VC, et al: 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
- 74) Zeron MM, Fernandes HB, Krebs C, Shehadeh J, Wellington CL, et al: 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
- 75) 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, 2007, p209
- 76) Peng PL, Zhong X, Tu W, Soundarapandian MM, Molner P, et al: ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron* 49: 719-733, 2006
- 77) Kwak S, Weiss JH: Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol* 16: 281-287, 2006
- 78) 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

孤発性 ALS と興奮性アミノ酸

日出山 拓人 郭 伸

はじめに

孤発性 ALS の原因は未解明であるが、現在最有力の仮説がグルタミン酸による興奮性神経細胞死仮説である。長年にわたり AMPA (α -3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) 受容体を介する神経細胞死が ALS に関与することを示唆する知見が蓄積しており、AMPA 受容体の分子異常が ALS の病因と関連する可能性が論じられてきた。なかでも、われわれのグループによって AMPA 受容体サブユニットである GluR 2 Q/R 部位に RNA 編集がおこらない未編集型の GluR 2 増加による RNA 編集異常が孤発性 ALS 運動ニューロンに疾患特異的、細胞選択的に生じていることが発見された¹⁾。この分子変化がチャネルの Ca^{2+} 透過性亢進により神経細胞死を引き起こす直接原因になり、しかも変異 SOD 1 関連家族性 ALS を含めた他の神経変性疾患には生じない²⁾ことから孤発性 ALS の病因であると考えられる。

興奮性神経細胞死と孤発性 ALS

運動ニューロンにはグルタミン酸受容体が高密度で発現し³⁾、グルタミン酸による興奮が過剰になると Ca^{2+} などのイオン透過性亢進が引き起こされ、細胞内環境の変化を補償する機能を越えてしまい、結果として細胞死のカスケードが働く、というのが興奮性神経細胞死のメカニズムである。これは、主に虚血や低血糖、外傷、てんかん重積などの急性の神経細胞死に働くと考えられていた⁴⁾。一方で近年、培養細胞系、*in vivo* 動物実験系で急性には神経細胞死を引き起こさない濃度でも受容体が長期間持続的に興奮することで遅発性の神経細胞死がおこることが次々と明らかにされ、特に ALS でグルタミン酸受容体を介した経路が関与している可能性が注目されるようになった^{5,6)}。

グルタミン酸受容体は大きくイオンチャネル型と代謝調節型に分類され、イオンチャネル型は更に NMDA 受容体、カイニン酸受容体、AMPA 受容体に分けられる。NMDA

受容体が急性の神経細胞死に関与するのに対して特に速いシナプス伝達に関わる AMPA 受容体はニューロンの遅発性の細胞死に関与し、運動ニューロンは後者の興奮性細胞死に特に脆弱である。AMPA 受容体を介する神経細胞死は、この受容体チャネルからの過剰な Ca^{2+} 流入に引き続いておこることが培養細胞で明らかにされ⁷⁾、AMPA 受容体を介する神経細胞死が ALS の神経細胞死に働いていることを示唆するものである。

AMPA 受容体は GluR 1-GluR 4 の 4 種のサブユニット単独または様々な組み合わせからなる 4 量体で Ca^{2+} 透過性は GluR 2 サブユニットが含まれるかどうかにより決まる。GluR 2 を 1 個以上含む AMPA 受容体は Ca^{2+} 非透過性で、含まない場合は Ca^{2+} 透過性である。ただし、GluR 2 は転写後に Q/R 部位の RNA 編集を受けて初めて Ca^{2+} 非透過性を獲得するので未編集型 GluR 2 を含む AMPA 受容体も Ca^{2+} 透過性である。

これらの結果を踏まえ、われわれのグループは神経細胞死に関連する分子変化である GluR 2 の減少 (Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の割合の増加) ないし GluR 2 Q/R 部位の編集率低下 (Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の実質的増加) の有無を ALS の運動ニューロンで検討した。Kwak らは、孤発性 ALS 脊髄前角組織レベルで GluR 2 mRNA 発現量に有意な減少がないこと⁸⁾、そして部位選択的・疾患特異的な GluR 2 Q/R 部位の編集率が低下していること⁹⁾を報告しており、さらに laser microdissector を用いて凍結剖検組織から単一神経細胞を切り出し、孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンの単一神経細胞レベルの検討において、GluR 2 Q/R 部位の編集率低下が部位特異的、疾患特異的に生じていることを確認した¹⁾。図 1 に示すように、正常対照群の運動ニューロンでは、全例 GluR 2 Q/R 部位は 100% RNA 編集されていたが、ALS 群では 0~100% とばらつき、平均値は 38~75% と低下していた。ALS 群における小脳 Purkinje 細胞の編集率は、正常対照群と同様にほぼ 100% に保たれていた。また、他の変性疾患である歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の小脳 Purkinje 細胞を検索したが、編集率は正常対照と同様のレベルによく保たれていた。

ひでやま たくと 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

かく しん 同 准教授

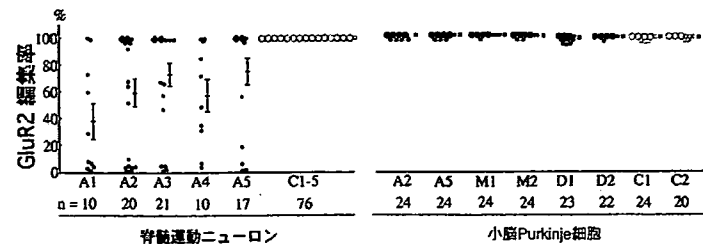


図1 単一神経細胞における GluR 2 Q/R 部位 RNA 編集率 (Kawahara¹¹より改変)

各点(大きな点は5細胞, 小さな点は1細胞)は, ALS 群5例(A1-A5), コントロール群5例(C1-C5)の単一脊髄運動ニューロンにおける GluR 2 Q/R 部位の RNA 編集率と, ALS 群2例(A2, A5), multiple system atrophy (MSA, 多系統萎縮症)群2例(M1, M2), dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA, 歯状核赤核淡蒼球リ体萎縮症)群2例(D1, D2), コントロール群2例(C1, C2)の単一小脳 Purkinje 細胞の編集率を表している。平均値±標準誤差と解析した細胞数(n)も示した。運動ニューロンにおける正常コントロール76個の内訳は, C1;28, C2;12, C3;13, C4;12, C5;11である。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において, 例外なく編集率は100%であった。これに対して, ALS 群では, 解析した5例すべてにおいて, 編集率は運動ニューロンごとに0%から100%まで大きくばらつき, 平均値も正常コントロール群と比較し, 有意に低下していた (Mann-Whitney U test, $p < 0.001$)。一方, 小脳 Purkinje 細胞における編集率については, ALS 群, MSA 群, DRPLA 群とコントロール群の間には有意差はない (Mann-Whitney U-test, $p > 0.05$)。

さらに症例数を増やし, 古典型, PBP, ALS-D, 好塩基性封入体出現する若年発症例¹⁰⁾のように表現型は異なるが孤発性 ALS と診断された症例について GluR 2 mRNA の Q/R 部位の編集率を調べたところ, 臨床像の異なるこれらの孤発性 ALS でも運動ニューロンにおける編集率は全て低下しており, 共通の分子異常が発症のメカニズムにあることが推測された¹¹⁾。一方で SOD 1 関連性家族性 ALS (ALS1) モデルラットや SBMA (球脊髄性筋萎縮症) の運動ニューロンでは同部位の編集率は正常群と同様であり²⁾, この分子変化が運動ニューロン死に非特異的に関連するものでなく, 運動ニューロン疾患の中でも運動ニューロン死のメカニズムは様々であると考えられた。ALS1 と痴呆を伴う ALS を含む孤発性 ALS とでは興奮性神経細胞死の分子メカニズムが異なることは, 孤発性 ALS 運動ニューロン, 前頭側頭型痴呆 (FTLD) の皮質ニューロンの細胞内封入体に見出される異常にリン酸化された, ないし断片化した TDP-43 が ALS1 の運動ニューロン封入体には見出されていない^{12,13)} ことによっても病因が異なることを示唆し, 変異 SOD 1 によりもたらされる運動ニューロン死を孤発性 ALS の病因と結びつけることはできないことを意味している。他方, アンドロゲン受容体の CAG

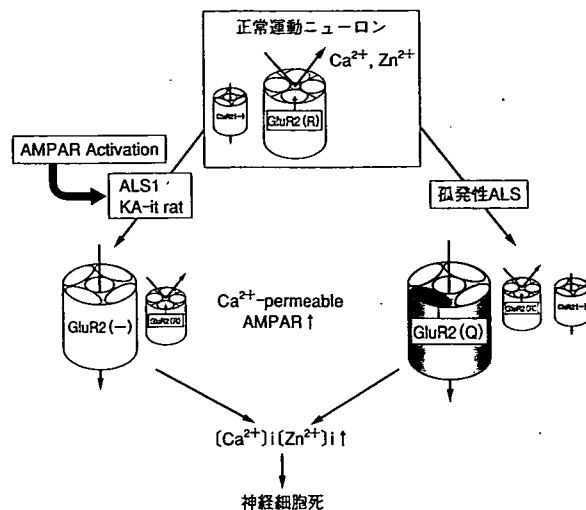


図2 AMPA 受容体を介する運動ニューロンの神経細胞死の機序のまとめ (Kwak¹⁶より改変)

哺乳類の正常運動ニューロンの AMPA 受容体 (AMPA) は, ほぼ100%が編集型 GluR 2(R) であり Ca^{2+} 非透過性である。わずかながら運動ニューロンで GluR 2 を含まない Ca^{2+} 透過性の高い AMPAR が存在することが知られている。本文で述べたように孤発性 ALS, ALS1 のいずれにも AMPAR を介した細胞死のメカニズムのエビデンスがあるが, 両者のメカニズムは異なっている。孤発性 ALS では未編集型 GluR 2(Q) が増加することで透過性 AMPAR が増加し, 一方で ALS1 では GluR 2 の割合の減少により編集型 GluR 2 を含まない透過性 AMPA 受容体の割合が増加することで細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し, 神経細胞死のカスケードが生じる。ただし, 前者が単独で神経細胞死が生じるのに対して, 後者は SOD 1 の細胞毒性などの因子が加わる必要がある。

リピート伸長による SBMA では, GluR 2 Q/R 部位の RNA 編集異常はないことをわれわれは示したが²⁾, AMPA 受容体を介した神経細胞死自体が働いていないと考えられることが同じポリグルタミン病である Huntington 病モデルマウスでの検討から示唆される^{14,15)}。このように運動ニューロン疾患の神経細胞死には図2に示すように, 異なる複数の分子メカニズムが独立に働き, ALS には AMPA 受容体を介する運動ニューロン死が働いているものの単一の分子メカニズムではないことが推測される¹⁶⁾。

以上から, 孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンで認められた GluR 2 Q/R 部位の RNA 編集異常は, 細胞選択的かつ疾患特異的な分子変化であり, 神経細胞死に直接関わっている可能性が高いと考えられる。運動ニューロンの Ca^{2+} 透過性 AMPA レセプターを介する細胞死に対する脆弱性は, 人工的に作成した Ca^{2+} 透過性 AMPA レセプターサブユニットを導入した GluR-B(N) ミニ遺伝子導入マウスが, 痙攣などをおこさずに12ヶ月間生存するが, 脊髄運動ニューロンの減少を示すことによっても示されている。特

に Ca^{2+} 透過性 AMPA レセプターを介するニューロン死が緩徐進行性であることは注目に値し、孤発性 ALS の運動ニューロンに見出された GluR 2 の分子異常が、神経細胞死の直接原因になっている可能性が高い。このような選択性・特異性を生む機序としては、脊髄運動ニューロンの AMPA 受容体総 mRNA 発現量および GluR 2 サブユニットの AMPA 受容体サブユニット全体に占める比率が、他のニューロンに比べて低く^{8,17)}、もともと Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の割合が多いために RNA 編集低下の影響を受けやすいことが一因になっていると考えられる。何故 GluR 2 Q/R 部位の RNA 編集異常がおこるのかについては、この部位の RNA 編集を特異的に触媒する RNA 編集酵素 adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR 2) の活性が低下しているためであると考えられるが^{18~20,22)}、その理由は明らかではない。ただ、RNA 編集がある種の神経細胞選択的におこることは、近年の Peng ら²¹⁾ の、一

過性脳虚血後に海馬 CA 1 錐体細胞に生ずる遅発性神経細胞死が、ADAR 2 mRNA 発現低下による GluR 2 Q/R 部位 RNA 編集低下に伴うものであり、CA 1 錐体細胞に選択的であることから示唆され、なんらかの細胞特異性が外的内的ストレスに対する代償不全をおこし、遅発性細胞死を運動ニューロンや CA 1 錐体細胞などの一部の神経細胞に引き起こすと考えられる。このように ADAR 2 活性低下が GluR 2 Q/R 部位の RNA 編集異常を通じて遅発性の神経細胞死を引き起こす直接原因であり、しかも運動ニューロンはこの分子変化に最も脆弱であると考えられる。

このよう孤発性 ALS 脊髄前角組織では正常対照に比し、ADAR 2 mRNA 発現量が低く、ALS 脊髄運動ニューロンでは ADAR 2 の酵素活性が低下していることが GluR 2 Q/R 部位 RNA 編集異常の原因と考えた。この仮説を証明し、特異的治療方法に結びつけられるように私たちのグループは ADAR 2 の解析を進めている。

文 献

- 1) Kawahara Y, Ito K, Sun H, et al. RNA editing and death of motor neurons. *Nature*. 2004 ; 427 : 801.
- 2) 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. *Neurosci Res*. 2006 ; 54 : 11-4.
- 3) 五嶋良郎. グルタミン酸受容体の歴史とその背景. *Clin Neurosci*. 2006 ; 24 : 142-4.
- 4) Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol*. 1986 ; 19 : 105-11.
- 5) 相澤仁志, 中村良司, 郭 伸. 実験的遅発性興奮性運動ニューロン死. *Clin Neurosci*. 1998 ; 16 : 58-62.
- 6) 郭 伸. 興奮性アミノ酸と神経障害—神経疾患の実験動物モデル. *Annual Review 神経* 1992. 中外医学社 ; 1992. p. 15-30.
- 7) Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, et al. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 ; 90 : 6591-5.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Aizawa H, Kimura T, Hashimoto K, et al. Basophilic cytoplasmic inclusions in a case of sporadic juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 2000 ; 176 : 106-13.
- 11) 郭 伸, 日出山拓人, 西本祥仁, 他. 孤発性 ALS の脊髄前角における RNA 編集異常と病型. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業神経変性疾患に関する調査研究班報告書. 2007. p. 64-5.
- 12) Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD 1 mutations. *Ann Neurol*. 2007 ; 61 : 427-34.
- 13) Tan CF, Eguchi H, Tagawa A, et al. TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD 1 gene mutation. *Acta Neuropathol*. 2007 ; 113 : 535-42.
- 14) Levine MS, Klapstein GJ, Koppel A, et al. Enhanced sensitivity of N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci Res*. 1999 ; 58 : 515-32.
- 15) Zeron MM, Hansson O, Chen N, et al. Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron*. 2002 ; 33 : 849-60.
- 16) Kwak S, Weiss JH. Calcium-permeable AMPA channel in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol*. 2006 ; 16 : 281-7.
- 17) Sun H, Kawahara Y, Ito K, et al. Expression profile of AMPA receptor subunit mRNA in single adult rat brain and spinal cord neurons in situ. *Neurosci Res*. 2005 ; 52 : 228-34.
- 18) Kwak S, Kawahara Y. Deficient RNA editing of GluR 2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med*. 2005 ; 83 : 110-20.
- 19) 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.
- 20) 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*. 2005 ; 6 : 131-44.
- 21) Peng PL, Zhong X, Tu W, et al. ADAR 2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR 2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron*. 2006 ; 49 : 719-33.
- 22) Higuchi M, Maas S, Single FN, 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.