

- mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319, 1668-1672.
- Swanson G, Kamboj S, Cull-Candy S (1997) Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *J Neurosci* 17:58-69
- Takuma, H., Kwak, S., Yoshizawa, T., Kanazawa, I. 1999. 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.
- Van Deerlin, V.M., Leverenz, J.B., Bekris, L.M., Bird, T.D., Yuan, W., Elman, L.B., Clay, D., Wood, E.M., Chen-Plotkin, A.S., Martinez-Lage, M., Steinbart, E., McCluskey, L., Grossman, M., Neumann, M., Wu, I.L., Yang, W.S., Kalb, R., Galasko, D.R., Montine, T.J., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Schellenberg, G.D., Yu, C.E., 2008. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet Neurol.* 7, 409-416.
- Verdoorn T, Burnashev N, Monye rH, Seeburg P, Sakmann B (1991) Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 252:1715-1718
- Yang, Y., Hentati, A., Deng, H.X., Dabagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W.Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A.C., Cole, N., Gascon, G., Yagmour, A., Ben-Hamida, M., Pericak-Vance, M., Hentati, F., Siddique, T., 2001. 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.
- Yokoseki, A., Shiga, A., Tan, C.F., Tagawa, A., Kaneko, H., Koyama, A., Eguchi, H., Tsujino, A., Ikeuchi, T., Kakita, A., Okamoto, K., Nishizawa, M., Takahashi, H.,

Onodera, O., 2008. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 63, 538-542.

## Legends for Table and Figures

Table 1 Sequences of primers and fluorescent hybridization probes used for quantitative polymerase chain reaction.

Figure 1 TetHeLaG2m cell line.

(A) Schematic figure of the GluR2 minigene with pTRE-Tight Vector.

(B) Editing efficiencies at the Q/R site of GluR2 minigene pre-mRNA in conventional HeLa and TetHeLaG2m cell lines cultured in a dish for 48 h. Each symbol represents the extent of Q/R site-editing of GluR2 minigene pre-mRNA isolated from a single culture dish. Each large symbol represents the results of five culture dishes. For each cell line, the mean  $\pm$ SEM (n=15-30) is also indicated.

(C) Culture time-dependent changes of editing efficiency at the Q/R site of GluR2 minigene pre-mRNA and expression levels of ADAR2 mRNA and GluR2 pre-mRNA, and relative abundance of ADAR2 mRNA to GluR2 pre-mRNA in the TetHeLaG2m cell line. TetHeLaG2m cells were plated at a low concentration ( $5 \times 10^5$  cells/well in 6-well plate). The relative abundance of ADAR2 mRNA to GluR2 pre-mRNA increases in parallel with the editing efficiency at the GluR2 Q/R site in a time-dependent manner. For each culture time, the mean  $\pm$  SEM (n=6) is also indicated.

Figure 2 Method of detecting editing efficiency at the Q/R site of GluR2.

(A) Scheme for detecting editing efficiency at the Q/R site of GluR2. Open bars represent nested PCR products. Intrinsic *BbvI* recognition sites are indicated by vertical solid arrowheads. The sizes of the DNA fragments generated by restriction digestion are indicated.

(B) Example of the quantification of editing efficiency using a 2100 Bioanalyzer. The molarity of the 129-bp (derived from edited GluR2 pre-mRNA) and 71-bp (derived from both edited and unedited GluR2 pre-mRNA) bands was quantified after restriction digestion with *BbvI* for 12 h, and the editing efficiency was calculated as the ratio of the former to the latter. The lower figure indicates gel-like image produced by the 2100 Bioanalyzer.

GluR, glutamate receptor; Q, glutamine; R, arginine; PCR, polymerase chain reaction

### Figure 3 Editing extent of GluR2 Q/R site

Editing efficiency in TetHeLaG2m cells after treatment with antidepressants (0-10  $\mu$ M) for 24 h is expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 5 to 8). Statistical analysis was performed by the one-way ANOVA test followed by Dunnett's multiple comparison test (\*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001).

GluR, glutamate receptor; Q, glutamine; R, arginine; ANOVA, analysis of variance

### Figure 4 Expression levels of ADAR2 mRNA, GluR2 mRNA and GluR2 pre-mRNA

Amounts of RNA that were upregulated by seven out of eight antidepressants that upregulated by GluR2 Q/R site-editing (A, B, C, D, E, F, and G) were quantitatively analyzed. The amounts of ADAR2 mRNA, GluR2 mRNA, and GluR2 pre-mRNA are expressed as values relative to that of  $\beta$ -actin mRNA. The amount of ADAR2 mRNA is also expressed as a value relative to that of GluR2 mRNA. Mean  $\pm$  SEM of at least 5-8 wells are displayed. Statistical analysis was performed with Steel's multiple comparison test (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

GluR, glutamate receptor; ADAR, adenosine deaminase acting on RNA; Q, glutamine; R, arginine

Table 1

	Oligonucleotide sequence
GluR2	
Forward primer	5'-ATGCGATATTTGCGCAAGA-3'
Reverse primer	5'-CAGTCAGGAAGGCAGCTAAGTT-3'
Universal Probe Library probe #63	5'-CTCCTCCT-3'
pre-GluR2	
Forward primer	5'-GATGGTGTCTCCCATCGAAA-3'
Reverse primer	5'-TCCATAAGCAATTTCTGTTTGCT-3'
Universal Probe Library probe #73	5'-GCTGAGGA-3'
ADAR2	
Forward primer	5'-GTGTAAGCACGCGTTGACTG-3'
Reverse primer	5'-CGTAGTAAGTGGGAGGGAACC-3'
Universal Probe Library probe #42	5'-GCTGGATG-3'
$\beta$ -actin	
Forward primer	5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'
Reverse primer	5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'
Universal Probe Library probe #64	5'-CCAGGCTG-3'

Figure 1

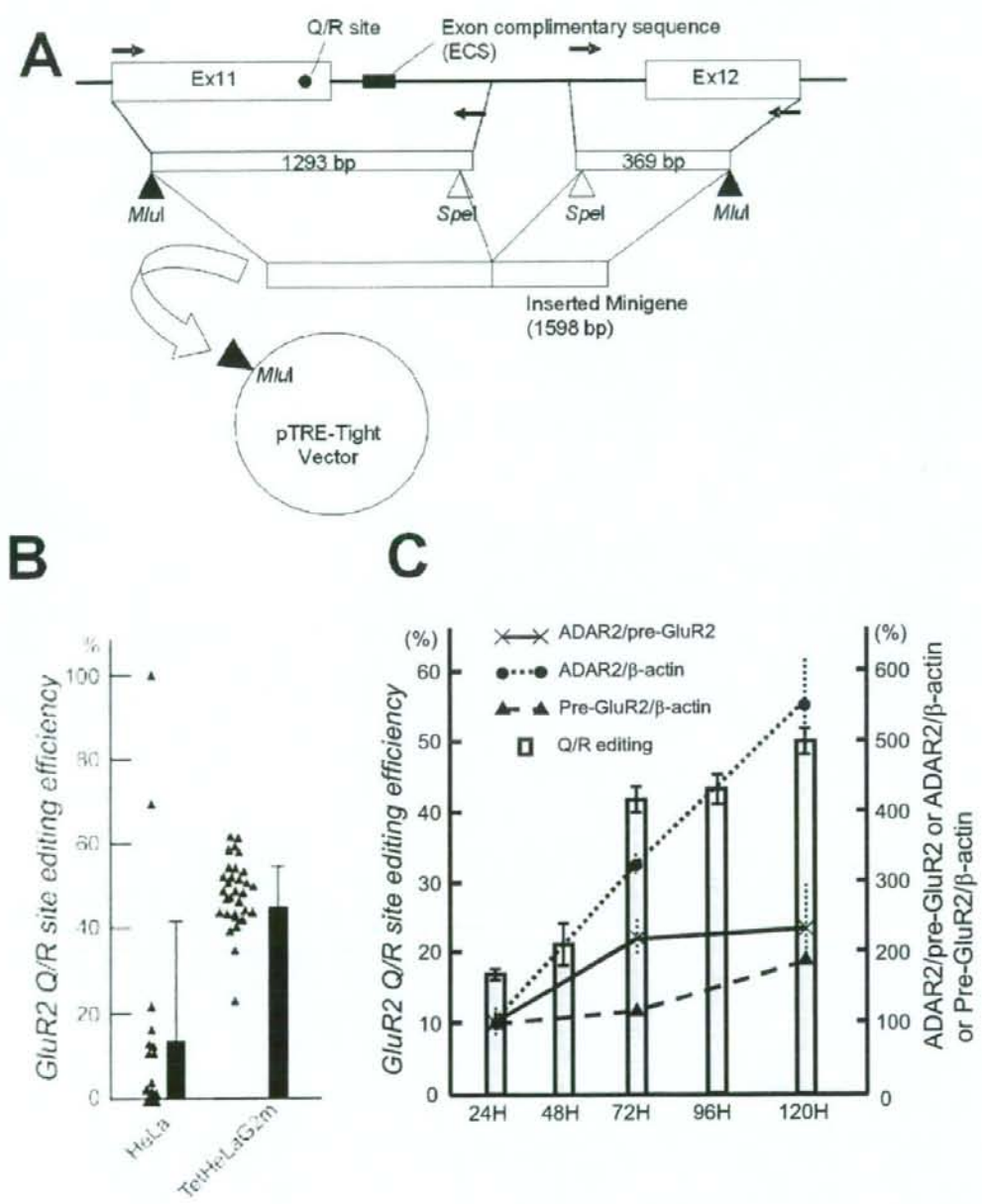


Figure 2

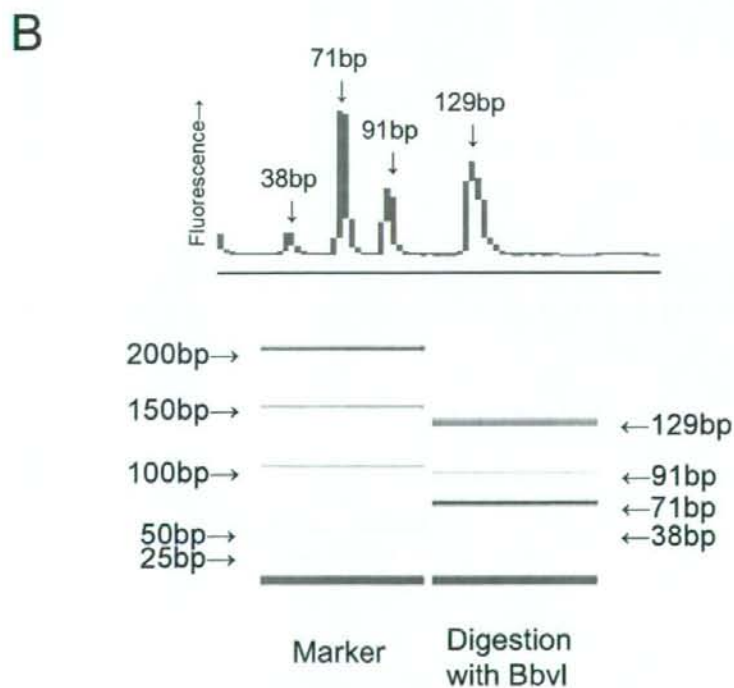
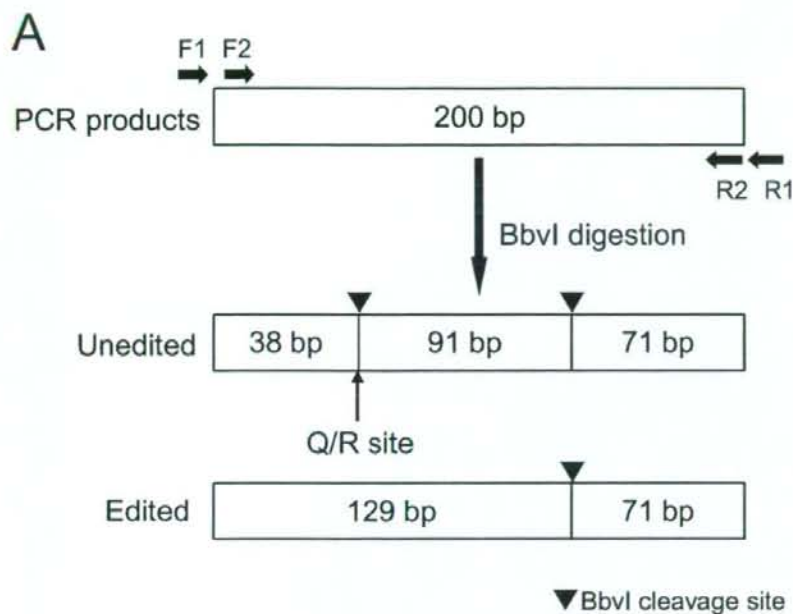


Figure 3

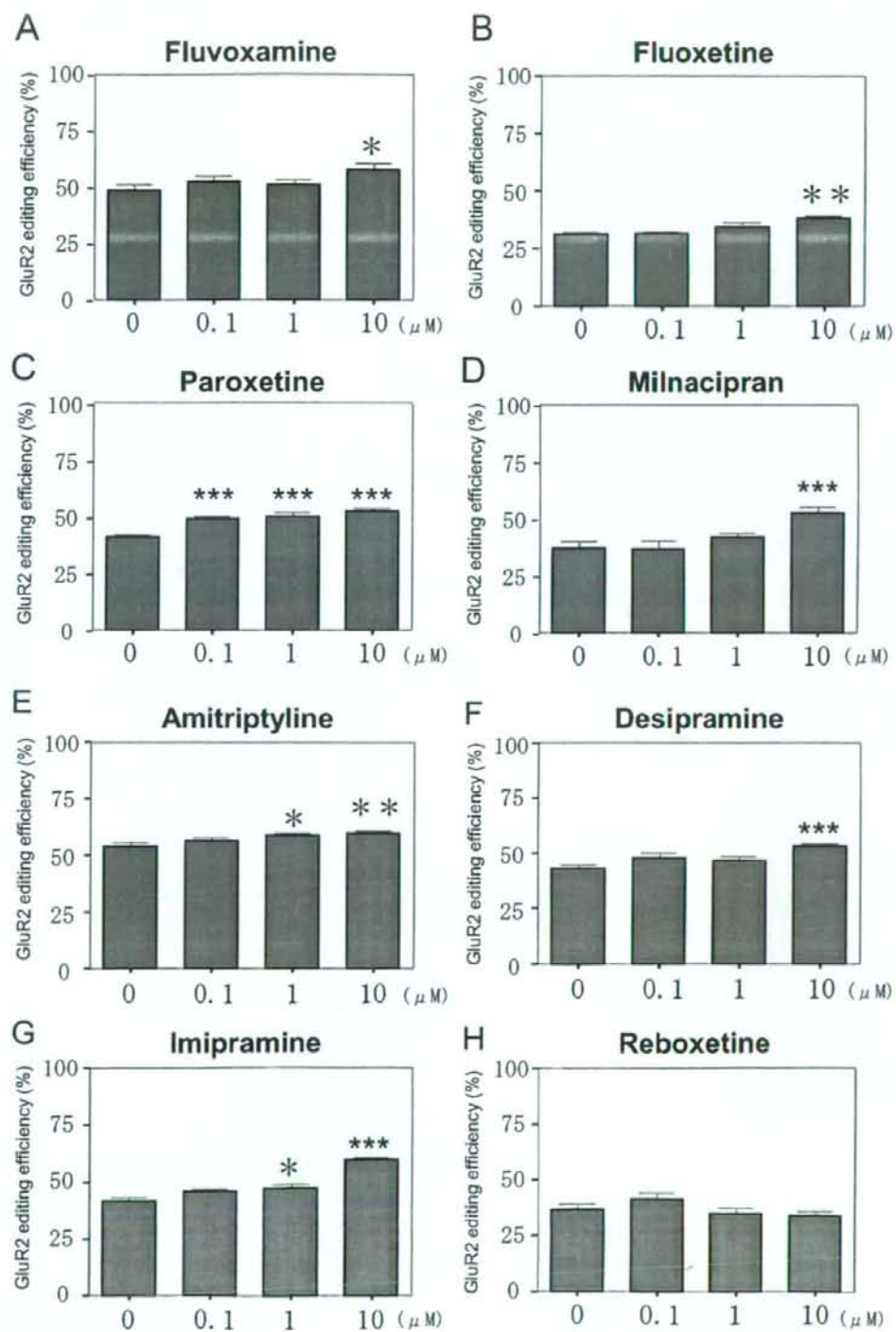
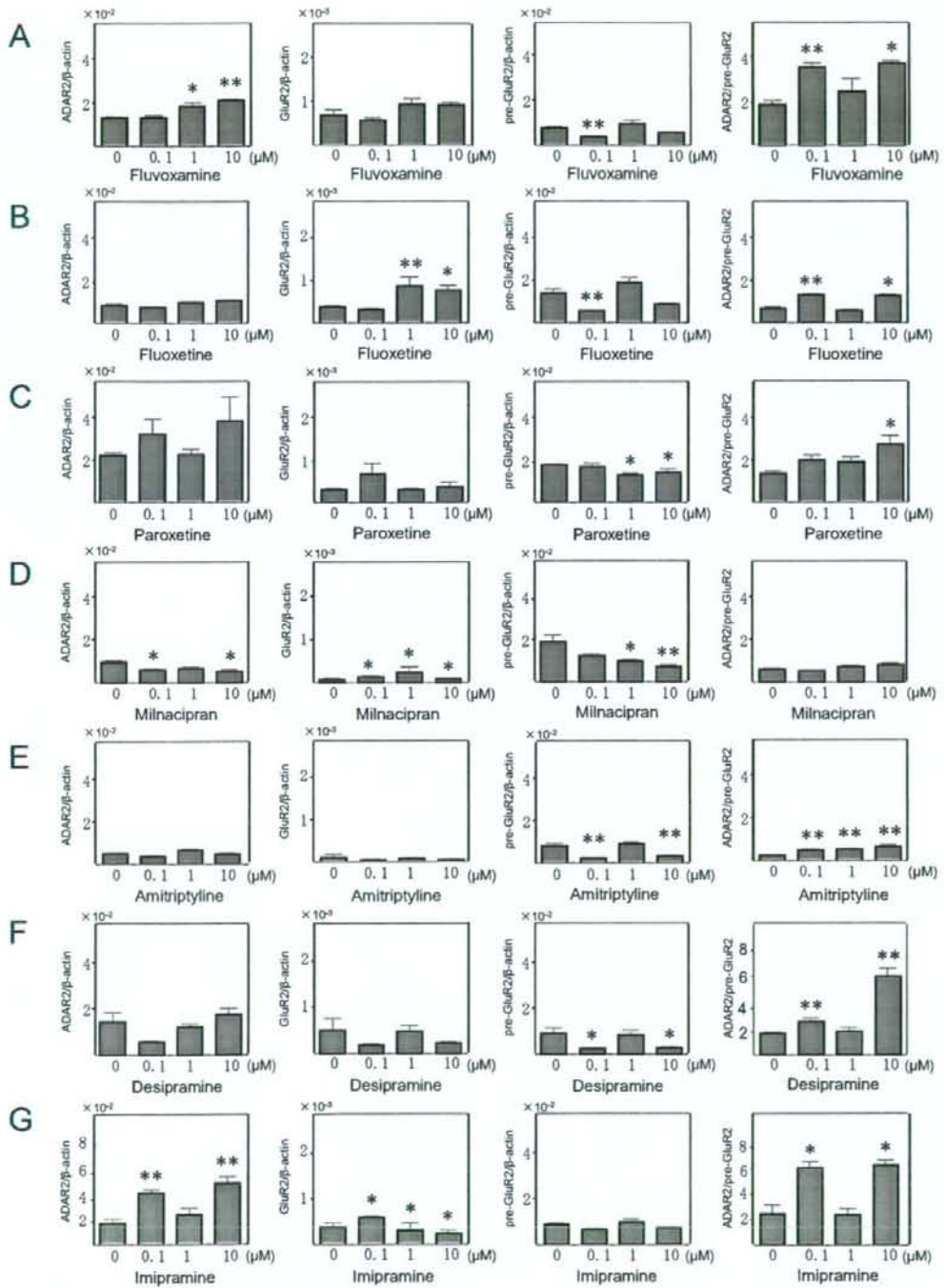




Figure 4



シンポジウム2 「神経疾患の電磁気刺激による診断と治療」

前庭神経の経皮的微弱ランダム電流刺激による神経疾患の治療の試み

郭 伸<sup>1)</sup>・Struzik, Zbigniew R<sup>2)</sup>・相馬 りか<sup>2)</sup>  
大橋 恭子<sup>2)</sup>・潘 衛東<sup>1)</sup>・山本 義春<sup>2)</sup>

Amelioration of symptoms in neurological disorders  
by noisy vestibular stimulation

Shin Kwak<sup>1)</sup>, Zbigniew R Struzik<sup>2)</sup>, Rika Soma<sup>2)</sup>  
Kyoko Ohashi<sup>2)</sup>, Weidong Pan<sup>1)</sup>, Yoshiharu Yamamoto<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Neurology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

<sup>2)</sup> Educational Physiology Laboratory, Graduate School of Education, University of Tokyo

By means of noisy galvanic vestibular stimulation (GVS), it might be possible to ameliorate the blunted responsiveness of degenerated neuronal circuits in patients with degenerative neurological diseases. We evaluated the effects of 24-hour noisy GVS on the long-term heart rate dynamics in patients with multiple system atrophy and on the daytime trunk activity dynamics in patients with either levodopa-responsive Parkinson's disease or levodopa-unresponsive parkinsonism patients. Patients were also examined for cognitive performance by means of a continuous performance test. Short-range or high-frequency fluctuations of the heart rate were significantly increased by the noisy GVS as compared with that by sham stimulation, suggestive of improved autonomic, especially parasympathetic, responsiveness. The long-range anti-persistence of trunk activity patterns probed by an autocorrelation measure was significantly increased by the noisy GVS, suggestive of quickening of bradykinesic rest-to-active transitions. The mean reaction time in the continuous performance test was also significantly decreased by the noisy GVS, without significant changes in either the omission or commission error ratios, which is suggestive of improved motor execution during the cognitive task. Thus, noisy GVS improved the motor and autonomic responsiveness and is effective for ameliorating the symptoms in patients with multiple system atrophy or Parkinson's disease.

**Key words:** stochastic resonance, galvanic vestibular stimulation, parkinsonism, heart rate

緒 言

神経変性疾患では、特定の神経回路網を形成するニューロンが選択的に変性脱落し、しかも再生力の極めて乏しいニューロンを再生させる有効な

<sup>1)</sup> 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

<sup>2)</sup> 同 教育学研究科 総合教育科学専攻 身体教育学

方法がない現状では、残存するシナプス伝達の強化が治療戦略の中心になる。神経伝達物質の補充、分解阻止、アゴニストの投与などの薬物療法はこれを目指したものである。これに対して、神経伝達が電気活動に由来していることから、物理的に神経伝達を強化しようという方法が試みられてきている。末梢神経の直接的な電気刺激や、中枢神経の電気・磁気刺激などはこの範疇にはいる。しかし、これらの試みが非生理的な強い刺激を非選択的に与えることにより、低下した神経伝達の強化をねらっているのに対し、生理的な神経伝達を選択的に賦活できないかという試みがある。此処で述べる方法は、表面電極を通じて、ランダムな微弱電流により前庭神経を非観血的に刺激して、神経変性疾患で神経脱落により低下したシナプス伝達を強化することにより、障害された機能を改善させようとするものである。その根拠となる理論は、確率共振理論であり、非線形システムにおける応答が、適度な強さのノイズを与えることにより促進する、というものである<sup>1)</sup>。非線形システムである神経系のシナプス伝達は、こ

の理論が働く場である。

適度な強度のノイズの存在が微弱な信号の検出に役立つという現象が「確率共振（確率共鳴）」と呼ばれている非線形システム特有の物理現象で、20年以上前から理論的考察や電気回路での検討が行われている<sup>2)~5)</sup>。非線形システムとは、入力信号に対する応答、すなわち出力が入力信号の大きさに比例しないシステムのことである。神経伝達は神経細胞の脱分極（発火）により行われるので、閾値を境にした入力信号の強さにより非線形の挙動を示す点では、確率共振の働きうる場である。すなわち、閾値以下の微小な入力信号は神経細胞の発火にはつながらないが、ランダムな広帯域ノイズを同時印加した場合、膜電位が閾値を超える瞬時確率は入力信号の強弱に依存する。しかし、出力信号の信号雑音比（S/N比）は、ノイズ強度が膜電位に届かないほど小さすぎたり、入力信号の強弱に影響されないほど大きすぎたりした場合には低下するので、「出力S/N比 vs ノイズ強度」曲線は釣り鐘型になる（図1）。近年、さまざまな生物の感覚器官でこの現象が観察され

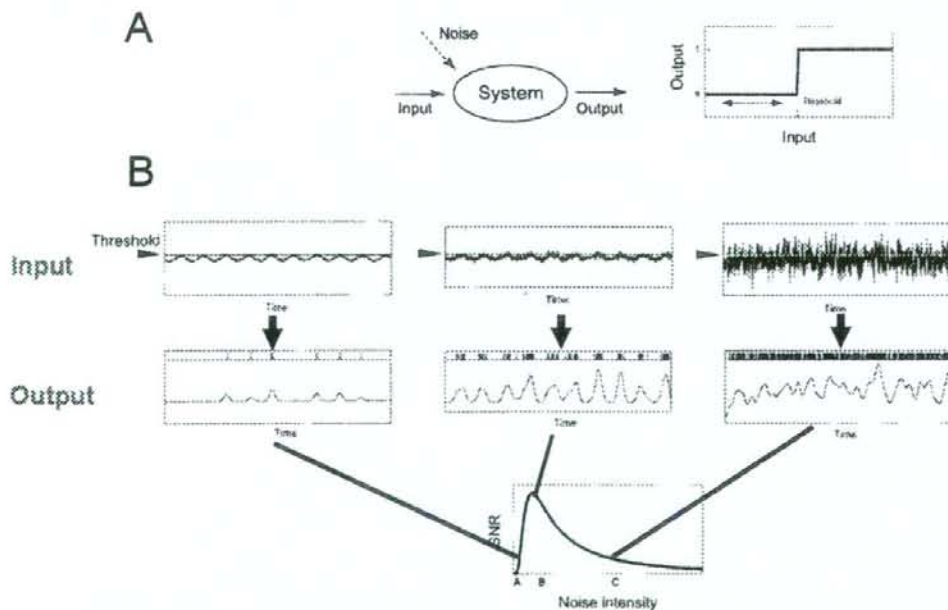


図1 確率共振の概念図。A：非線形システム。B：Aの右図に示した両矢印の範囲のノイズを印加した場合のノイズ強度とSN比。ノイズの強度と共に釣り鐘型のSN比を示す。

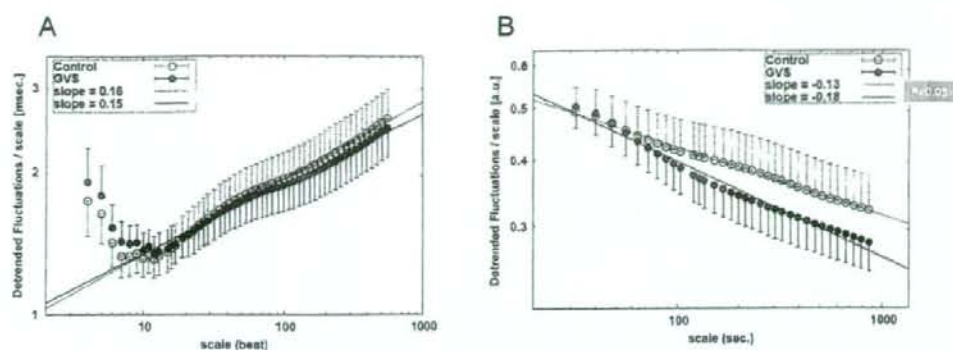


図2 A: MSA患者に対する経皮的な前庭電気ノイズ刺激が心拍拍動間隔に及ぼす影響。横軸は変化を観察する区間幅。この値が大きい方が変化速度は遅い。縦軸はその区間に含まれる心拍動間隔ゆらぎの大きさ。通電によって速い心拍変動成分が増加している。黒: ノイズあり, 白: ノイズなし。B: パーキンソン病を呈するMSA患者とパーキンソン病患者の体動に対する経皮的な前庭ノイズ刺激の影響。横軸は変化を観察する区間幅, 縦軸はその区間に含まれる体動の大きさ。この結果では経皮的な前庭電気刺激によって横軸が大きい領域, すなわちゆっくりした変動の成分が減少していることから, 経皮的な前庭ノイズ刺激ではゆっくりした動作の比率が相対的に減少している, すなわちすばやい動作の比率が多くなると解釈される。黒: ノイズあり, 白: ノイズなし。(文献17より)

ており, 外部から生体に印加したノイズが個体としての感受性を高めることを示す研究結果が, ザリガニの尾の有毛細胞<sup>3)</sup>, コオロギの尾の気流感知細胞<sup>4)</sup>, ヘラチョウザメの捕食行動<sup>47)</sup>やラットの皮膚感覚受容器<sup>8)</sup>などで報告されている。ヒトにおいても, 指先に与えた微細な触覚刺激の弁別課題では, 閾値下のノイズを加えることにより, ノイズレベルに従い, 正答率が一旦上昇し, 過大なノイズで再び低下するという, 確率共振に特有の応答曲線が得られる<sup>9)</sup>。さらに, ヒトの頸動脈圧受容体へのノイズ刺激により心拍応答が高まること, およびそれが確率共振によることを示す証拠が得られている<sup>10)11)</sup>。我々は, 同様の方法が, 重篤な起立性低血圧を主徴とする Shy-Drager 症候群の患者における血圧変動を抑える効果があることも明らかにし<sup>12)</sup>, 神経疾患の治療に応用できる可能性を確認したことが, 今回の研究の先行研究となっている。この他, ヒトの疾患への確率共振の臨床応用研究としては, 聴力の改善<sup>5)13)</sup>, 体性感覚の改善<sup>14)</sup>, 弱視者における視力の改善<sup>15)</sup>などの例がある。

通常, 脳内の神経を表面電極から刺激するのは非常に困難だが, 前庭神経は耳介後部の乳様突起に貼付した電極に電流を通じると刺激される。個

人差もあるが 1 mA 前後の電流で前庭感覚すなわち身体動揺感を引き起こす。さらに, 前庭神経は, 自律神経中枢や, 小脳との線維連絡をもつ解剖学的位置からして, 体外からの刺激を中枢神経に伝達するには最も適当である。循環系との関連は生理学的にも解剖学的にもよく知られてきた知見であり, 前庭神経核は小脳片葉, 虫部を通じて大脳基底核との線維連絡があるので, 前庭神経核におけるシナプス伝達が強化されることにより, 運動機能への影響もあり得る。したがって, シナプス伝達の低下している神経変性疾患の脳で, 前庭神経を通じた神経回路を賦活することにより, 自律神経中枢や運動中枢を間接的に賦活し, 低下した自律機能・運動機能を高めることができる可能性がある。我々は, 健康人を用いた検討をふまえ<sup>16)</sup>, 自律神経や運動機能障害のある神経疾患患者に適用することにより神経症状の改善に役立つのではないかと考え, 多系統萎縮症 (MSA) およびパーキンソン病 (PD) について検討を加えた結果を報告する<sup>17)</sup>。

#### 方法

東京大学医学部附属病院神経内科に入院中の MSA および PD 患者の協力を得て, 耳介後部の乳様突起両側に表面電極を貼付し, 手掌大の刺激

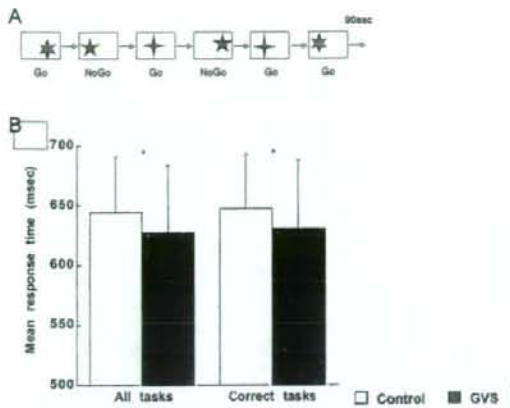


図3：高次脳検査の内容。A：三種類のシンボルの何れか1個が、2秒ごと100ミリ秒間ディスプレイに表示される。シンボルは、それぞれ、Go（ボタンを押す）、NoGo（ボタンを押さない）のいずれかを指示しており、被検者はその指示に従う。B：この検査に対する反応時間がGVSにより、有意に短くなった。正答率には有意差はない。（文献17より）

装置（サイズ112×67×28 mm；プラスチックカバーを含む重量200 gm，デンソー社製）により刺激を行った。電流の波形は、平均0 mVの振幅をもち、強度と方向（+/-）が0.01-2.0 Hzの間で入れ替わる1/fノイズとし、最大強度でも本人にはわからない強度（0.33 mA±0.20 mA）とした。この電流強度は健常者を対象とした先行研究で最大効果の得られた痛覚閾値の60%に対応するものである<sup>10</sup>。連続する2日のうち1日を24時間連続電気刺激、もう1日を刺激なしとして心拍数と体幹の加速度および認知能力を比較した。通電感覚の有無を試験終了後に全ての被検者に尋ねたが、この刺激強度では、通電、非通電を区別できなかった。また、刺激装置内部に取り付けたスイッチのみによって通電の有無を確認できるようになっており、担当医にも通電の有無を伝えず、完全な二重盲検を実施した。

入院中の通常の活動（食事、リハビリなど）には支障をきたさないよう、刺激装置と心拍数/体動計測・記録器（AMZ-720，日本光電ウェルネス社製）を腰に巻いたポケット付のベルトに収納して常時携帯してもらった。通電感覚がないために偽薬効果を考慮する必要がないほか、通電強度が

大きい場合に生じるめまいの心配もない。したがって、通電しない日にも通電する日と同様に通電用の電極を貼付した上で刺激装置一式を携帯してもらい、さらに患者本人には本当の刺激開始時刻は知らせないこととした。検査の二日間はなるべく同じ活動パターンになるよう心がけてもらい、服薬内容も一定とした。認知能力テストにはコンピュータを内蔵した腕時計型の装置（Rupure-Pro; Seiko Instruments）を用い、2秒ごとに次々と液晶画面に表示される図形の形に応じた操作（ボタンをできるだけ速く押す/ボタンを押さない）を90秒間繰り返すという課題を一日数回行った。測定にあたっては、倫理委員会の承諾を得たのち、患者に十分な説明の上、書面による同意を得た。

自律神経系への効果は心拍数の変動性から評価した。ただし、心拍数は、記録中さまざまな理由により増減する。睡眠中は低くリハビリや散歩などの活動中は高い。検査中の2日間の行動は完全には一致するわけではないので、運動量の違いによる影響を除外する必要がある。したがって、detrended fluctuation analysis DFA法と呼ばれる手法<sup>18</sup>を用いて、行動状態に依存しない心拍数のゆらぎの大きさを、変動のスピードごとに評価した。日中の体幹の動きもDFA法により解析した。

### 結果

前庭電気ノイズ刺激により、心拍数の「速やかな」変化の大きさが増加した（図2A）<sup>17</sup>。10拍以下のスケールでの解析では、心拍の揺らぎが増加しており、特に4拍前後では呼吸性不整脈を反映していると思われる。効果のあった変化スピードでの心拍数の増減は主に迷走神経系の活動に依存することが知られており、前庭電気ノイズ刺激による迷走神経活動の亢進が示唆された。より大きなスケールでの解析では、図に示す様に10拍から1000拍の広い範囲で、直線的に揺らぎの幅が大きくなっているが、傾きは前庭電気ノイズ刺激により小さくなっている。この傾きは循環調節系の動作不全に起因する揺らぎがもつ傾向特徴を表すので、傾きが小さいことは、揺らぎがよりランダムである白色雑音に近いこと、すなわち微細調節がより正常に近く行われていることを意味する。MSA患者では、自律神経障害により、心拍変動が減少する。したがって、この結果は、前庭電気

ノイズ刺激により自律神経機能が改善したことを示唆する。

一方、PD患者およびパーキンソン症を呈するMSA患者の動作について同様の解析を行った結果、前庭電気ノイズ刺激によって傾きが $-0.13$ から $-0.18$ へと小さくなった(図2B)。このことは、動作の休止・活動の切り替えが全体的にすばやくなることを意味し、パーキンソン症に見られるアキネジアが改善した可能性が示唆された<sup>17)</sup>。

認知能力テストでは、図形が表示されてからボタンを押すまでにかかる時間が、正答した問題、全ての問題とも有意に短縮した(図3)。

### 考 察

このように、経皮的な前庭電気ノイズ刺激法はMSAおよびPDの症状軽減に有効であることが示された。この方法は、電気刺激の不快感なく効果が得られる上に、通電されていること自体を本人が意識できないため、研究結果の解釈上偽薬効果を全く考慮する必要がない。例えば循環応答への効果は、起立性低血圧にはよい効果を及ぼすが、平常血圧の場合には何らの影響も及ぼさない。特に、Shy-Drager症候群における起立性低血圧に対しては昇圧剤によるコントロールが通常採られる治療法だが、臥位高血圧という副作用がある。GVSでは、落ちてしまった循環応答は改善するが、正常な循環応答は修飾しないので、このような副作用は理論的にはおこさないと考えられる。長期的な適用例はないが、これまでの適用例には自覚的副作用は生じなかった。ただし、現在行っている通電強度での改善度は臨床的な快癒が得られるほどのものではなく、薬物療法の補完的治療法としての位置づけであるが、至適強度ではより大きな効果が出る可能性があり、今後の検討課題である。

通常、神経に対して電気刺激を行い、なんらかの効果を得ようとする場合、電流・電圧が高い方が神経を強く刺激し効果も大きいと考えがちであるが、本研究の動作原理では電流が大きいからといって必ずしも効果が増大するというわけではない。実際、定常電流を流すと強い浮動感、眩暈が生ずるのみで、むしろ循環系、運動機能には不利な影響を及ぼす。すなわち、印加した電流は前庭神経の活動を非生理的に上げて臨床像の変化を引

き起こしたのではなく、電流の印加により、生理的な神経伝達効率に変化が生じ、それが神経変性により低下していたシナプス伝達を強化することにより臨床的に好ましい結果を生んだという、確率共振理論に則った作用によると考えられる。これは、直接に神経を過剰興奮させることにより、神経の可塑性変化を引き起こさせることで神経症状を改善させることが目的の電気刺激・磁気刺激法とは異なった作用である。

この手法は電気刺激の波形にその特徴がある。通常、電気刺激による治療法では規則的な波形や連続するパルス波で刺激するのが一般的である。しかし本研究では、強度・方向がともにランダムに変化するノイズ電流を使用した。このノイズ電流は、「確率共振」という物理現象を理論的根拠としたものだからである。緒言にも述べたように、動物の神経自体の入力と出力の関係が非線形であるため、さまざまな動物種の脳や感覚受容器で確率共振を実際に起こさせ得ることが近年次々と実験的に示されてきている。本研究ではMSAの心拍変動に効果がみられたが、心拍数の調節システムも非線形の要素を含む。圧反射の感受性変化は、頸動脈圧受容器へのノイズ印加によって高められることが山本らにより確かめられている<sup>10)11)</sup>。更に、この方法でShy-Drager症候群患者の圧反射を高めることができ、起立性低血圧の程度を軽減することができた。

前庭電気ノイズ刺激が圧反射を改善するメカニズムは、前庭器からは頸動脈圧受容器からの信号とともに脳幹の孤束核に神経入力があることが知られている。したがって、経皮的に前庭を電気刺激すれば孤束核にノイズが入り、その結果圧反射の感受性が向上する可能性がある。実際に健常者を対象として前庭神経から電氣的ノイズを加え、圧反射応答が改善すること、しかも釣鐘型の反応曲線を描くことが示されている<sup>10)</sup>。これは定常的な刺激を加えても得られない効果であり、確率共振によって圧反射の応答を向上させたと考えられる。

パーキンソン症に対する効果は、DFAによる解析により判定した。この方法は、運動パターンの持続性を解析するもので、値が大きいほど変動の切り替わりが少ないことを表す。GVSによりDFA値が長い時間幅の解析で低下したことは

動作の切り替わりが頻繁であること、動きが活発であることを意味する。臨床的には、パーキンソニズムのアキネジアの評価につながると考えられる。実際、パーキンソン病の患者さんの動きを加速度記録計で長期間記録し、DFAの変法で解析すると、治療前より治療後の方が低い値になることが明らかになった。パーキンソニズムには症状の変動があるが、個々の患者で重症、軽症の時間帯ごとに解析した値も同様の結果であり、運動量の多寡にかかわらず、アキネジアの重症度に相関した値の変化が見られることが分かった<sup>10)</sup>。パーキンソン病患者の日常生活動作を左右する因子の最大のものアキネジアの重症度であり、GVSによりアキネジアが軽減したことは、患者の自覚にはつながらなくても、転倒予防などの効果があると考えられる。GVSの効果がどの様な経路で生じているのかは、圧反射への影響ほど単純ではない。もし、神経回路網を通じての効果であるとすれば、緒言で述べたように、小脳片葉・虫部と大脳基底核に線維連絡があることが示唆される。このことを確かめるには、機能画像などによる検索が必要となる。現在の知見からは直接的な神経回路網の賦活以外の要因も否定することは難しい。

循環応答、パーキンソニズムに対する治療効果の作用機序の解明と同時に、GVSが効果を及ぼす症状、改善の程度、等をより詳細に検討し、治療法としての妥当性を明らかにする必要がある。特にパーキンソニズムにおける転倒予防や、起立性低血圧による失神予防などでは、フィードバック機構に関わる神経回路網のわずかな改善が臨床的改善をもたらすので、GVSのよい適用と考えられる。特に長期的な適用によるこれらの破局的症状に対する予防効果の有無は重要な検討事項である。

## 文 献

- 1) Wiesenfeld, K. & Moss, F: Stochastic resonance and the benefits of noise: from ice ages to crayfish and SQUIDS. *Nature* 373, 33-36, 1995
- 2) Collins, J.J., Chow, C.C. & Imhoff, T.T: Stochastic resonance without tuning. *Nature* 376, 236-238, 1995
- 3) Douglass, J.K., Wilkens, L., Pantazelou, E. et al: Noise enhancement of information transfer in crayfish mechanoreceptors by stochastic resonance. *Nature* 365, 337-340, 1993
- 4) Levin, J.E. & Miller, J.P: Broadband neural encoding in the cricket cercal sensory system enhanced by stochastic resonance. *Nature* 380, 165-168, 1996
- 5) Morse, R.P. & Evans, E.F: Enhancement of vowel coding for cochlear implants by addition of noise. *Nat Med* 2, 928-932, 1996
- 6) Greenwood, P.E., Ward, L.M., Russell, D.F., et al: Stochastic resonance enhances the electrosensory information available to paddlefish for prey capture. *Phys Rev Lett* 84, 4773-4776, 2000
- 7) Russell, E.V. & Israeloff, N.E: Direct observation of molecular cooperativity near the glass transition. *Nature* 408, 695-698, 2000
- 8) Collins, J.J., Imhoff, T.T. & Grigg, P: Noise-enhanced tactile sensation. *Nature* 383, 770, 1996
- 9) Richardson, K.A., Imhoff, T.T., Grigg, P., et al: Using electrical noise to enhance the ability of humans to detect subthreshold mechanical cutaneous stimuli. *Chaos (Woodbury, N.Y)* 8, 599-603, 1998
- 10) Hidaka, I., Ando, S., Shigematsu, H., et al: Noise-enhanced heart rate and sympathetic nerve responses to oscillatory lower body negative pressure in humans. *J Neurophysiol* 86, 559-564, 2001
- 11) Hidaka, I., Nozaki, D. & Yamamoto, Y: Functional stochastic resonance in the human brain: noise induced sensitization of baroreflex system. *Phys Rev Lett* 85, 3740-3743, 2000
- 12) Yamamoto, Y., Hidaka, I., Iso-o, N., et al: Noise-induced compensation for postural hypotension in primary autonomic failure. *Brain Res* 945, 71-78, 2002
- 13) Zeng, F.G., Fu, Q.J. & Morse, R: Human hearing enhanced by noise. *Brain Res* 869, 251-255, 2000
- 14) Liu, W., Lipsitz, L.A., Montero-Odasso, M., et

- al: Noise-enhanced vibrotactile sensitivity in older adults, patients with stroke, and patients with diabetic neuropathy. *Arch Phys Med Rehabil* 83, 171-176, 2002
- 15) Levi, D.M. & Klein, S.A: Noise provides some new signals about the spatial vision of amblyopes. *J Neurosci* 23, 2522-2526, 2003
- 16) Soma, R., Nozaki, D., Kwak, S. et al: 1/f noise outperforms white noise in sensitizing baroreflex function in the human brain. *Phys Rev Lett* 91, 078101, 2003
- 17) Yamamoto, Y., Struzik, Z.R., Soma, R., et al: Noisy vestibular stimulation improves autonomic and motor responsiveness in central neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* 58, 175-181, 2005
- 18) Peng, C.K., Havlin, S., Stanley, H.E. et al: Quantification of scaling exponents and cross-over phenomena in nonstationary heartbeat time series. *Chaos (Woodbury, N.Y)* 5, 82-87, 1995
- 19) Pan, W., Ohashi, k., Yamamoto, Y. et al: Power-law temporal autocorrelation of activity reflects severity of parkinsonism. *Mov Disord* 22, 1308-1313, 2007

---

原稿到着：平成19年3月2日

別刷請求先：郭 伸

〒113-8655 文京区本郷7-3-1

東京大学医学部附属病院神経内科

E-mail: kwak-ky@umin.net



## 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 ( $\alpha$ -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 GluR2 Q/R 部位に RNA 編集がおこらない未編集型の GluR2 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<sup>1)</sup>。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 SOD1 関連家族性 ALS を含めた他の神経変性疾患には生じない<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>、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<sup>4)</sup>。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<sup>5,6)</sup>。

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<sup>7)</sup>、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 GluR1-GluR4 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 GluR2 サブユニットが含まれるかどうかにより決まる。GluR2 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、GluR2 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 GluR2 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 GluR2 の減少 ( $Ca^{2+}$  透過性 AMPA 受容体の割合の増加) ないし GluR2 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 GluR2 mRNA 発現量に有意な減少がないこと<sup>8)</sup>、そして部位選択的・疾患特異的な GluR2 Q/R 部位の編集率が低下していること<sup>9)</sup>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、GluR2 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<sup>1)</sup>。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 GluR2 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GluR2 Q/R部位RNA編集率 (Kawahara<sup>11</sup>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GluR2 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, 歯状核赤核淡蒼球イ体萎縮症)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, 好塩基性封入体が出現する若年発症例<sup>10)</sup>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GluR2 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<sup>11)</sup>。一方でSOD1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<sup>2)</sup>, 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<sup>12,13)</sup> ことによっても病因が異なることを示唆し, 変異SOD1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

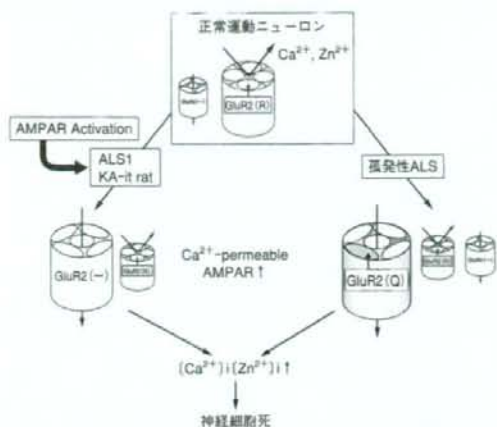


図2 AMPA受容体を介する運動ニューロンの神経細胞死の機序のまとめ(Kwakら<sup>16)</sup>より改変)

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GluR2(R)でありCa<sup>2+</sup>非透過性である。わずかながら運動ニューロンでGluR2を含まないCa<sup>2+</sup>透過性の高いAMPA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AMPA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GluR2(Q)が増加することで透過性AMPAが増加し, 一方でALS1ではGluR2の割合の減少により編集型GluR2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<sup>2+</sup>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SOD1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, GluR2 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<sup>2)</sup>, 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<sup>14,15)</sup>。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<sup>16)</sup>。

以上から, 孤発性ALS脊髄運動ニューロンで認められたGluR2 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<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>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ヵ月間生存するが, 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 GluR2 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 GluR2 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<sup>8,17)</sup>、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 GluR2 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 (ADAR2) の活性が低下しているためであると考えられる<sup>18-20, 22)</sup>、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<sup>21)</sup> の、一

過性脳虚血後に海馬 CA1 錐体細胞に生ずる遅発性神経細胞死が、ADAR2 mRNA 発現低下による GluR2 Q/R 部位 RNA 編集低下に伴うものであり、CA1 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 CA1 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 ADAR2 活性低下が GluR2 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、ADAR2 mRNA 発現量が低く、ALS 脊髄運動ニューロンでは ADAR2 の酵素活性が低下していることが GluR2 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 ADAR2 の解析を進めている。

## 文 献

- Kawahara Y, Ito K, Sun H, et al. RNA editing and death of motor neurons. *Nature*. 2004; 427: 801.
- Kawahara Y, Sun H, Ito K, 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*. 2006; 54: 11-4.
- 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.
- Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol*. 1986; 19: 105-11.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kawahara Y, Kwak S, Sun H, et al. Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem*. 2003; 85: 680-9.
- Takuma H, Kwak S, Yoshizawa T, et al. 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*. 1999; 46: 806-15.
- 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.
- 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報告書. 2007. p. 64-5.
- Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol*. 2007; 61: 427-34.
- Tan CF, Eguchi H, Tagawa A, et al. TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathol*. 2007; 113: 535-42.
- 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.
- 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.
- Kwak S, Weiss JH. Calcium-permeable AMPA channel in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol*. 2006; 16: 281-7.
- 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.
- Kwak S, Kawahara Y. Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med*. 2005; 83: 110-20.
- Kawahara Y, Ito K, Sun H, et al. 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*. 2003; 18: 23-33.
- 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.
- Peng PL, Zhong X, Tu W, et al. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron*. 2006; 49: 719-33.
- 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 ADAR2. *Nature*. 2000; 406: 78-81.