

200833016B

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18年度～20年度 総合研究報告書

主任研究者 郭 伸

平成21年(2009年)4月

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18年度～20年度 総合研究報告書

主任研究者 郭 伸

平成21年(2009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	-----	6
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	10

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 東京大学准教授

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

〔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、疾患特異的な分子異常である。GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は、RNA 編集酵素 adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2) により触媒されることより、孤発性 ALS 運動ニューロンでは ADAR2 活性が低下していると考えられる。したがって、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。この仮説の基に、本研究課題において、ADAR2 活性賦活物質のスクリーニングシステムの確立を目標とし、1) ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスの開発と ADAR2 活性低下による GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常が緩徐進行性の神経細胞死の直接原因であることの証明、2) ADAR2 活性の *in vitro* アッセイのための培養細胞系の開発・確立、および ADAR2 活性賦活物質のスクリーニング、3) *in vivo* における ADAR2 活性を反映するマーカーの開発、4) 一次スクリーニングで得た候補物質の野生型マウス運動ニューロンでの評価、5) この分子メカニズムに基づいたモデルマウス運動ニューロンにおける ADAR2 活性賦活作用の検討、を行い、マウス運動ニューロンで ADAR2 活性を賦活する物質を複数同定した。この課題により運動ニューロン死の分子メカニズムに基づいた治療法開発研究に有用なツールが揃い、治療薬候補物質が得られたといえる。

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 の Q/R 部位 における RNA 編集が不完全であること、この分子異常は 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)。大多数の AMPA 受容体は  $Ca^{2+}$  透過性が低い、これは、サブユニット

に編集型 GluR2 (Q/R 部位がアルギニン R) を含むことに依る。ところが、未編集型 GluR2 (Q/R 部位がグルタミン Q) を含む AMPA 受容体は GluR2 を含まない AMPA 受容体同様  $Ca^{2+}$  透過性が高い。正常のニューロンは編集型 GluR2 のみを発現し、未編集型 GluR2 を発現しないので、AMPA 受容体の大多数は  $Ca^{2+}$  非透過性である。GluR2 mRNA の Q/R 部位は、RNA 編集酵素 ADAR2 (adenosine deaminase acting on RNA 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)。したがって、ADAR2 活性が低下すると未編集型 GluR2 が増加し、 $Ca^{2+}$  透過性 AMPA 受容体が増え、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を通じて神経細胞死を引き起こすと考えられる。実際、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、ADAR2 活性が低下していることが未編集型 GluR2 の増加を引き起こしていると考えられる。この仮説が正しければ、ADAR2 活性を上げることにより運動ニューロン死を阻止し、孤発性ALSの進行を抑止する治療法の開発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、ADAR2 活性賦活物質候補を得ることを目的とする。

## B. 研究方法

1. 培養細胞を用いた *in vitro* におけるスクリーニングシステムの開発と ADAR2 活性賦活物質のスクリーニング

1-1) ADAR2 の活性を測定するための培養細胞系としての条件として、豊富な GluR2 mRNA を発現し、かつその Q/R 部位の RNA 編集率が 30-70%程度であることが必要である。また、臨床応用を目指す点からは、ヒト由来の培養細胞系であることが望ましい。この条件を満たす培養細胞を、各種のヒト由来培養細胞において総 RNA 抽出、GluR2 に対する RT-PCR、その PCR 産物の制限酵素処理断片の定量による Q/R 部位編集率の測定により検討した。

1-2) 従って、スクリーニング用の培養細胞系を、HeLa 細胞に GluR2 遺伝子の exon11-intron 11-exon 12 からなるミニ遺伝子 (GluR2-mini) を導入することにより開発した (TetHeLaG2m 細胞系)。

1-3) この TetHeLaG2m 細胞を用いて、0.1-10 $\mu$ M 濃度の薬剤に 24 時間暴露後の GluR2 Q/R 部位編集率の変化から、ADAR2 活性賦活作用のスクリーニングを行った。また、ADAR2 活性賦活作用のメカニズムの検討のために、ADAR2 mRNA、GluR2 mRNA/pre-mRNA の発現量の変化を解析した。

2. ADAR2 のコンディショナルノックアウトによる孤発性 ALS モデルマウスの開発と、*in vivo* スクリーニングシステムの確立

2-1) 細胞培養系で ADAR2 活性を上げる薬剤が、*in vivo* 系でも効果があるかどうかを明らかにするためには、適切なモデル動物が必要である。しかし、既存の ADAR2 のノックアウトマウスは、生後 20 日までにけいれん重積のために死亡してしまうため、細胞死のメカニズム、治療効果判定のための疾患モ

デル動物としては不相当である。このため、孤発性 ALS のモデルマウスとして、Cre-LoxP システムを利用して ADAR2 を運動ニューロン選択的にノックアウトするマウスを開発した。アセチルコリン作動性ニューロン特異的プロモーターにより脊髄運動ニューロンに選択的に Cre を発現する VACHT/Cre マウス(4)と、ADAR2 遺伝子の一部を loxP で挟んだ遺伝子改変マウスとの交配により、脊髄運動ニューロンで ADAR2 遺伝子をノックアウトする変異マウスを作成した。このマウスの GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常、脊髄運動ニューロンの細胞死を生化学変化、形態変化から解析した。

2-2) また、ニューロンの GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は動物種を問わず 100%に保たれているので、ADAR2 により触媒される RNA 編集部位を持ち、ニューロンに豊富に発現する mRNA が発見できれば、野生型マウスを用いた ADAR2 活性のスクリーニングが可能となる。*In vivo* における ADAR2 活性の測定に必要な、新たな ADAR2 基質を、ヒト脳核分画における ADAR2 結合 mRNA の中から探索した。mRNA の同定、編集部位の同定、RNA 編集が ADAR2 特異的に触媒されることの RNAi およびリコンビナント ADAR2 タンパクの導入による培養細胞を用いた検討を行い、上記の条件を満たすかどうかをヒト・マウス中枢神経で検討した。

2-3) TetHeLaG2m 細胞による *in vitro* スクリーニングで得られた ADAR2 活性賦活作用のある物質を野生型マウスに全身投与し運動ニューロンにおける ADAR2 活性の変化を検討した。これまでに確立した方法により、新たに見出した ADAR2 基質である cytoplasmic FMRP interacting protein 2 (CYFIP2) mRNA の K/E 部位の編集率変化を検討した。対照として、薬剤の溶解に用いた生理食塩水、エタノールを投与した。

2-4) ヘテロ接合体 ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスでは、ADAR2 活性が 50%程度に低下し、約 20%の運動ニューロンで GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率が低下している。これらの物質が、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常を改善するかどうかをこのヘテロ接合体マウスを用いて、同様の方法により脳脊髄組織、単一運動ニューロン組織で検討した。

(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 組換え実験指針に従った。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

### 1. 培養細胞を用いた in vitro におけるスクリーニングシステムの開発と ADAR2 活性賦活物質のスクリーニング

1-1) ヒト由来の HeLa 細胞, HEK293 細胞, グリオマ細胞, 神経芽細胞 SH-SY5Y 細胞における検討から, in vitro スクリーニングシステムとしての条件を満足する既存の培養細胞系は得られなかった(5)。

1-2) TetHeLaG2m 細胞は, GluR2-mini 遺伝子産物を豊富に発現し, しかもその Q/R 部位における編集率は 40-60% に一定していた。また, ADAR2 の RNAi により GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率が著減し, ADAR2 の導入で著明に編集率が增加することを確認した。さらに, ADAR2 の特異性の検討のため, 活性を持たない 1 塩基に変異をいれた ADAR2 の導入や, ADAR2 同様に RNA 編集活性を持つ ADAR1 の RNAi では変化しないことを確認した。以上より, この細胞系における GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の変化を測定することにより, ADAR2 活性賦活作用のスクリーニングに適していることを明らかにした。

1-3) Tet-HeLaG2m 細胞系を用いて, 50 種以上の物質につきスクリーニングを行い, 数種類の ADAR2 活性賦活作用のある薬剤を得た。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(5)。

### 2. ADAR2 のコンディショナルノックアウトによる孤発性 ALS モデルマウスの開発と, in vivo スクリーニングシステムの確立

2-1) ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウス ADAR2<sup>lox/lox</sup>/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(6,7)。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。

2-2) 新たな特異的 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 部位の編集率は 70-90% なので, この部位の編集率変化は ADAR2 の活性変化を反映する(8)。このことを ADAR2<sup>lox/lox</sup>/VChT-Cre マウスの解析により, 確認し, in vivo における ADAR2 活性のパラメータとして有用であることを明らかにした。

2-3) TetHeLaG2m 細胞で ADAR2 活性を賦活し ADAR2 mRNA 発現量を増加させた物質が, 全身投与により, 野生型マウスの脳脊髄組織, 単一運動ニューロンの CFIP2 K/E 部位の RNA 編集率を上昇させた。従って, これらの物質は in vivo でも運動ニューロンの ADAR2 活性賦活作用があると考えられる。

2-4) 前項で ADAR2 活性賦活作用が確認された物質は, ヘテロ接合体 ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスへの全身投与で, 脳脊髄組織, 運動ニューロンの GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率を上昇させた。したがって, ADAR2 の GluR2 Q/R 部位における RNA 編集活性を賦活することが明らかになり, ADAR2 活性低下による運動ニューロン死を抑制する作用が期待される。

## D. 結論

ADAR2 活性を in vitro, in vivo で評価するシステムを開発し, ADAR2 活性賦活物質のスクリーニングに有用であることを明らかにした。その結果, 複数の ADAR2 活性賦活物質候補を得た。本研究で確立した治療薬開発システムが, ADAR2 活性の賦活による孤発性 ALS の治療薬の開発研究に有用であることが明らかになった。

### (文献)

1. Kawahara Y, et al, *Nature* 427: 801 (2004)
2. Kwak S & Kawahara Y, *J Mol Med* 83: 110-120 (2005)
3. Higuchi M, et al, *Nature* 406: 78-81 (2000)
4. Misawa H, et al, *Genesis* 37: 44-50 (2003)
5. Sawada J, et al, *Neurosci Res*, in press.
6. Kwak S, et al, *Neurosci Res* 61: S204 (2008)



7. Hideyama T, et al, *Abstr Soc Neurosci*. 745: 17 (2008)
8. Nishimoto Y, et al, *Neurosci Res* 61: 201-206 (2008)

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue G, Tsuji S, Kwak S: Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death-causing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in SBMA patients or SOD1 transgenic rats. *Neurosci Res* 54:11-15, 2006
2. 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.
3. Hideyama T, Momose T, Shimizu J, Tsuji S, Kwak S: A PET study on the role of nigral lesions in parkinsonism in patients with ALS. *Arch Neurol* 63:1719-1722, 2006.
4. Kwak S, Weiss JH: Calcium permeable AMPA channel in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol* 16:281-287, 2006.
5. 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.
6. 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* 61:201-206, 2008.
7. Kwak S, Hideyama T, Yamashita T: AMPA receptor-mediated neuronal death in motor neuron diseases. In: *Amino Acid Receptor Research*, Eds. Paley BF, Warfield TE, Nova Science Publishers Inc. NY. pp 293-310, 2008.
8. Buckingham SD, Kwak S, Jones AK, Blackshaw SE, Sattelle DB: Edited GluR2, a gatekeeper for motor neuron survival? *BioEssays* 30:1185-1192, 2008.
9. Kwak S, Nishimoto Y, Yamashita T: Newly identified ADAR2-mediated editing positions as a useful tool for ALS research. *RNA Biology* 5:193-197, 2008.
10. Sawada J, Yamashita T, Aizawa H, Aburakawa Y, Hasebe N, Kwak S: Effects of antidepressants on GluR2 Q/R site-RNA editing in a modified HeLa cell line. *Neurosci Res* accepted

他 27 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.
2. Kwak S: RNA editing and motor neuron diseases. Japan-Korea Neuroscience Symposium "Cutting Edge of Neuroscience" A Satellites Symposium to Neuro2007, Yokohama, September 13, 2007.
3. Yamashita T, Kwak S, et al: 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, Kwak S, et al: Death of motor neurons in mice deficient in an RNA editing enzyme. *The 18<sup>th</sup>*

- an RNA editing enzyme. *The 18<sup>th</sup> International Symposium on MND/ALS. 2007*, Tronto, 30 Nov-2 Des, 2007.
5. 郭 伸、日出山拓人、ら：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、September 10-12, 2007.
  6. 日出山拓人、郭 伸、ら：RNA 編集異常による孤発性 ALS モデルマウスの開発。第 49 回日本神経学会総会、横浜、May 15-17, 2008.
  7. 澤田 潤、相澤仁志、山下雄也、郭 伸、ら：AMPA 受容体サブユニット GluR2 の Q/R 部位 RNA 編集率に及ぼす各種薬剤の効果。第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008.
  8. 郭 伸、日出山拓人、山下雄也、ら：RNA 編集異常による孤発性筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの作製。Mouse model of sporadic ALS by abnormality of RNA editing enzyme. 第 31 回神経科学大会、neuro2008、東京 July 9-11, 2008.
  9. 郭 伸：「TDP43 異常と運動ニューロン死を結ぶ分子異常」シンポジウム S3 前頭側頭葉変性症 (FTLD) と ALS における TDP-43 をめぐる最近の話題。第 27 回日本認知症学会、前橋、October 10-11, 2008.
  10. Hideyama T, Yamashita T, Kwak S, et al: Slow death of motor neurons in sporadic ALS mouse model by conditional targeting of RNA editing enzyme ADAR. *The 19<sup>th</sup> International Symposium on MND/ALS. 2008*, Birmingham, November 3-5, 2008.
  11. Kwak S: A-to-I RNA editing of GluR2 and ALS. Trinity Term 2008 Departmental Seminar. Department of Physiology, Anatomy and Genetics, Oxford Univ., Oxford, UK, November 7, 2008.
  12. Yamashita T, Kwak S, et al: Regulatory mechanism of GluR2 Q/R site-editing in cultured cell lines. *38th Annual Meeting Society for Neuroscience*, Washington, November 15-19, 2008.
  13. Hideyama T, Yamashita T, Kwak S, et al: Slow neuronal death of motor neurons in sporadic ALS mouse model by RNA editing enzyme ADAR2 knockout. *38th Annual Meeting Society for Neuroscience*, Washington, November 15-19, 2008.
  14. 郭 伸：「ALS の臨床と研究の現状」。平成 20 年度日本神経学会関東地区生涯教育講演会、東京、November 30, 2008.
  15. 日出山拓人、郭 伸ら：「孤発性筋萎縮性側索硬化症における RNA 編集酵素異常」シンポジウム「システムとしての神経疾患——病因解明と治療への新たな戦略」第 82 回薬理学会年会、横浜、March 16-18, 2009.
  16. 木村 大輔、日出山 拓人、鈴木 岳之、郭 伸：Neuronal death in tamoxifen-driven conditional ADAR2 knockout mice. 第 82 回薬理学会年会、横浜、March 16-18, 2009.
- 他 14 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
日出山拓人、 郭 伸	髄液細胞数・蛋白・糖.	中井利昭	検査値のみかた改訂3版	中外医学社	東京	2006	790-796
相澤仁志	中毒性疾患.	楠進	臨床病態学1、脳・神経系疾患	ヌーヴェルヒロカワ	東京	2006	211-221
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
Kwak S, Hideyama T, Yamashita T	AMPA receptor-mediated neuronal death in motor neuron diseases.		Amino Acid Receptor Research	Nova Science Publishers Inc		2008	293-310
相澤仁志、 菊池健次郎	脳血管疾患.	八重垣健、 吉田貴彦	こどものヘルスプロモーションー食育と健康支援	医歯薬出版	東京	2008	36-42
相澤仁志、 齋藤 司、 柴田健雄、 小林祥泰	[3]脳出血の実態 [4]重症度・予後と加齢・血圧の関係	小林祥泰	脳卒中データバンク2009	中山書店	東京	2009	136-137
郭 伸	Kugelberg-Welander病.		今日の診断指針第6版	医学書院	東京		印刷中

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
Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue G, Tsuji S, Kwak S	Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death-causing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in SBMA patients or SOD1 transgenic rats.	<i>Neurosci Res</i>	54	11-15	2006
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.	<i>J Neurochem</i>	98	782-791	2006

Hideyama T, Momose T, Shimizu J, Tsuji S, <u>Kwak S</u>	A PET study on the role of nigral lesions in parkinsonism in patients with ALS.	<i>Arch Neurol</i>	63	1719-1722	2006
<u>Kwak S</u> , Weiss JH	Calcium permeable AMPA channel in neurodegenerative disease and ischemia.	<i>Curr Opin Neurobiol</i>	16	281-287	2006
Struzik ZR, Hayano J, Soma R, <u>Kwak S</u> , Yamamoto Y	Aging of complex heart rate dynamics.	<i>IEEE Transaction of Biomedical Engineering</i>	53	89-94	2006
Mizuno Y, Amari M, Takatama M, <u>Aizawa H</u> , Mihara B, Okamoto K.	Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis.	<i>Acta Neuropathol (Berl)</i>	112	597-603	2006
Kobayashi H, Ngato T, Sato K, Aoki N, Kimura S, Tanaka Y, <u>Aizawa H</u> , Tateno M, Celis E.	In vitro peptide immunization of target tax protein human T-cell leukemia virus type 1-specific CD4+ helper T lymphocytes.	<i>Clin Cancer Res</i>	12 (12)	3814-3812	2006
<u>Aizawa H</u> , Aburakawa Y, Suzuki Y, Enomoto H, Makita Y, Kikuchi K, Kimura T, Yahara O.	Treatment of Asian restless legs syndrome patients with cabergoline. -An open clinical preliminary trial-.	<i>Intern Med</i>	45	453-455	2006
<u>Aizawa H</u> , Makita Y, Sumitomo K, Aburakawa Y, Katayama T, Nakatani-Enomoto S, Suzuki Y, Fujiwara K, Enomoto H, Kuroda K, Kimura T, Yahara O, Koyama S, Maruyama J, Nakamura M, Hasebe N, Kikuchi K.	Edaravone diminishes free radicals from circulating neutrophils in patients with ischemic brain attack.	<i>Intern Med</i>	45	1-4	2006
Mizuno Y, Amari M, Takatama M, <u>Aizawa H</u> , Mihara B, Okamoto K	Immunoreactivities of p62, an ubiquitin-binding protein, in the spinal anterior horn cells of patients with amyotrophic lateral sclerosis.	<i>J Neurol Sci</i>	249	13-18	2006
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 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.	<i>Neurology</i>	70	528-532	2008
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>	61	201-206	2008
Ishiura H, Morikawa M, Hamada M, Watanabe T, Kako S, Chiba S, Motokura T, Hangaishi 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>	65	662-665	2008
Massie A, Cnops L, Smolders I, McCullumsmith R, Kwak S, Arckens L, Michotte Y	High-affinity Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -dependent glutamate transporter EAAT4 is expressed throughout the rat fore- and midbrain.	<i>J comp Neurol</i>	511	155-172	2008
Buckingham SD, Kwak S, Jones AK, Blackshaw SE, Sattelle DB	Edited GluR2, a gatekeeper for motor neuron survival?	<i>BioEssays</i>	30	1185-1192	2008
Kwak S, Nishimoto Y, Yamashita T	Newly identified ADAR2-mediated editing positions as a useful tool for ALS research.	<i>RNA Biology</i>	5	193-197	2008
Pan W, Soma R, Kwak S, Yamamoto Y	Improvement of motor functions by noisy vestibular stimulation in central neurodegenerative disorders.	<i>J Neurol</i>	255	1657-1661	2008
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	61-3	2008

Sawada J, Yamashita T, Aizawa H, Aburakawa Y, Hasebe N, Kwak S	Effects of antidepressants on GluR2 Q/R site-RNA editing in a modified HeLa cell line.	<i>Neurosci Res</i>			accepted
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.	<i>Clinical Neuroscience</i>	24	222-225	2006
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
郭伸	家族性ALSの特徴.	医事新報	4296	87-88	2006
相馬りか、山本義春、郭伸	経皮的前庭電気ノイズ刺激は有効か?—パーキンソン病、多系統萎縮症に対する検討例の報告—.	難病と在宅ケア	12	49-53	2006
相澤仁志、榎本雪	帯状疱疹痛に対するガバペンチンの使用.	神経内科	66	210	2007
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.	<i>Brain and Nerve</i>	59	1117-1127	2007
郭伸、Struzik, Z R、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.	<i>Equilibrium Res</i>	67	58-64	2008
佐々木秀直、有村公良、糸山泰人、郭伸、吉良潤一、中島健二、天野隆弘、井上聖啓、魚住武則、幸原伸夫、辻貞俊、玉川聡、豊島至、水谷智彦、吉井文均、祖父江元、清水輝夫	モデル教育コア・カリキュラム及び卒前教育における神経内科の現状に関するアンケート全国調査.	臨床神経	131	229-239	2008
日出山拓人、郭伸	孤発性ALSと興奮性アミノ酸.	<i>Clinical Neuroscience</i>	26	303-305	2008
相澤仁志、長谷部直幸、菊池健次郎	合併症を伴う高血圧治療・脳.	血圧	15	41-47	2008
相澤仁志	脳卒中.	デンタルハイジーン	28	840-841	2008
齋藤司、相澤仁志、油川陽子、澤田潤、牧田圭弘、片山隆行、長谷部直幸、齋藤仁十、林恵充、安栄良悟、國本雅之、程塚明、田中達也、木村隆、藤原和彦、黒田健司、箭原修	旭川医科大学における脳卒中の診療実績とその検討.	脳卒中	30	668-673	2008



# 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。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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  非透過性である。しかしながら AMPA 型チャンネルの中には  $\text{Ca}^{2+}$  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。

$\text{Ca}^{2+}$  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ตอบสนอง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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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<sup>1)</sup>。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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  透過性 AMPA チャンネルの役割に焦点をしば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  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が起こり、持続的に細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  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 ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) の他にカイニン酸にも反応する。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  $\text{Ca}^{2+}$  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襲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 5 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 ( $\alpha$ -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 $\epsilon$ 1~4 (NR2) と GluR $\zeta$ 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 $\delta$ 1, GluR $\delta$ 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<sup>2)</sup>。GluR $\delta$ 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<sup>3)</sup>。

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入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<sup>2)</sup>。

## 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<sub>q</sub> 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 (IP<sub>3</sub>) を産生し, 細胞内から Ca<sup>2+</sup> を放出する。グループ II, グループ III は G タンパク質の G<sub>i</sub> を介し, アデニル酸シクラーゼを抑制し K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> チャネルを調整することから分類されている<sup>4)</sup>。

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 Ca<sup>2+</sup> の放出に伴う Ca<sup>2+</sup>-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

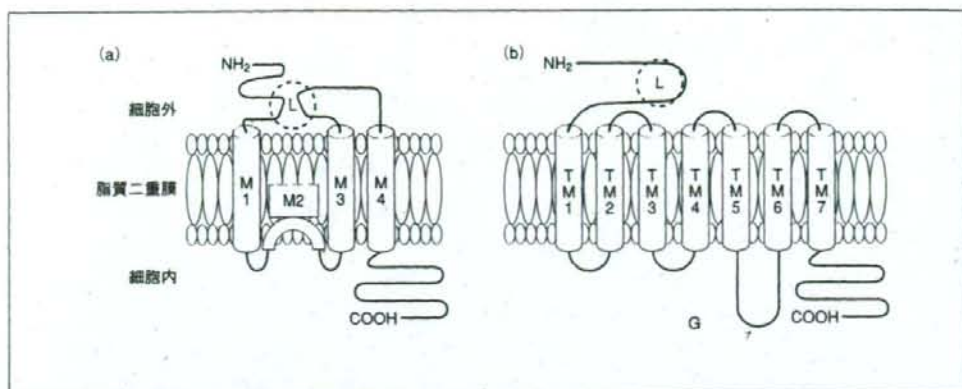


図9-1 イオンチャネル型、代謝調節型グルタミン酸受容体サブユニットの構造  
 (a) イオンチャネル型グルタミン酸受容体サブユニットの構造。グルタミン酸の結合予想部位がM1近傍のN末端領域とM3-M4間で形成される。M2は短い膜貫通ドメインで膜の中でループ構造をとり、両端が細胞内に面している。(b) 代謝調節型グルタミン酸受容体サブユニットの構造。7回膜貫通型の構造をもつ。TM1近傍のN末端領域にグルタミン酸の結合予想領域がある。TM5-TM6間にGタンパク質結合部位をもつ。Gタンパク質にシグナルが送られることでシグナル伝達系が機能する。Mは疎水性領域、Lはグルタミン酸結合予想部位、TMは膜貫通領域。

ることがわかっている<sup>5)</sup>。

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きうるが、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 Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>透過性は低くなり、全く存在しないと透過性が高くなる<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>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Ca<sup>2+</sup>の透過を阻害する<sup>8)</sup>(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



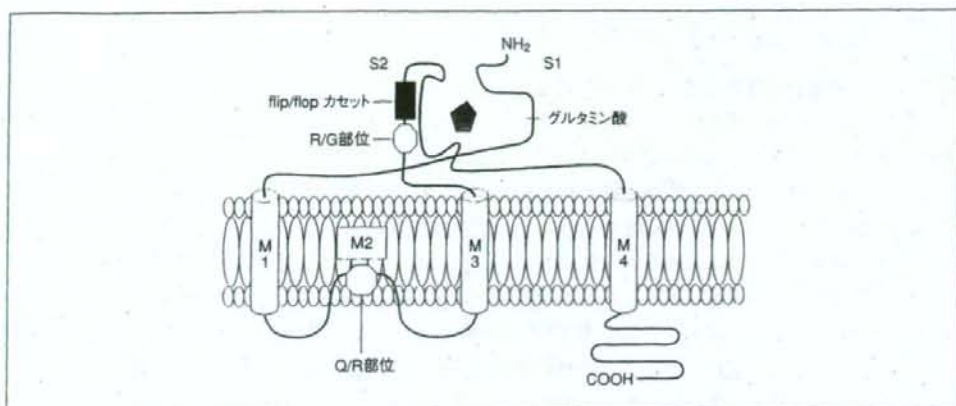


図9-2 グルタミン酸受容体サブユニットの構造

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Ca<sup>2+</sup>を透過しない、それに対して編集されたRになるとCa<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>透過性をもつ<sup>9)</sup>。

通常の場合で、ほとんどのニューロンはCa<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>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に関係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Ca<sup>2+</sup>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<sup>6), 10), 11)</sup>。したがって、GluR2の発現量、RNA編集率は機能的Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>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<sup>11)</sup>とは対照的に、最近の研究ではTNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )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Ca<sup>2+</sup>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<sup>12)</sup>。すなわち、Ca<sup>2+</sup>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<sup>13)</sup>、GluR2 mRNAの編集効率によって調節される場合が想定される<sup>14)</sup>。

## 9-4 ● Ca<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 負荷があれば、Ca<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 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<sup>15)</sup>。

以下に示す理由から、Ca<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> はほとんど流入しない。

Ca<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> の神経毒性が検討され、Ca<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 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<sup>16)</sup>。

## 9-5 ● 神経変性と疾患

### ■ 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<sup>2+</sup> 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<sup>17)</sup>、*in vitro* 系<sup>18)</sup> 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<sup>2+</sup> 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<sup>19)</sup>、<sup>20)</sup>。

したがって、Ca<sup>2+</sup> 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思われる。前述したように、Ca<sup>2+</sup> 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<sup>13)</sup>、GluR2 mRNA の編集率低下によって増加する場合がある<sup>14)</sup>。

以下に示す知見の多くは、前者のメカニズムによる Ca<sup>2+</sup> 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<sup>21)</sup>、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 チャンネルブロッカーは保護的に働く<sup>22)</sup>。つまり、 $Ca^{2+}$  透過性 AMPA チャン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<sup>18)</sup>。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 チャン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 チャン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 チャンネルを産生する GluR-B(N) マウス<sup>23)</sup> 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 チャン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<sup>19)</sup> が、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が減少していることがわかった<sup>14), 24)</sup>。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 チャンネルが増加し、細胞死をひき起こすと考えられる<sup>25)</sup>。

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<sup>26)</sup>。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 チャン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<sup>23)</sup>、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<sup>27)</sup>。逆に、運動ニューロンで  $Ca^{2+}$  透過性 AMPA チャン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<sup>28)</sup> 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<sup>26)</sup>、GluR2 発現量低下が  $Ca^{2+}$  透過性 AMPA チャン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<sup>29), 30)</sup>、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 チャン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<sup>23)</sup>、運動ニューロン死のメカニズムは一樣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) のブルキンエ細胞でも 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)<sup>14), 21)</sup>。

$Ca^{2+}$ 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<sup>1), 15)</sup>。

## 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<sup>32)</sup>、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<sup>33)</sup>、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<sup>34)</sup>。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<sup>1)</sup>。

$Ca^{2+}$ 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<sup>16)</sup>。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