

other words they exhibit milder akinesia, when the parkinsonism is mild than when it is severe. It is worthy to note that lower α -values for local maxima were obtained for all the patients after medication than before, and when in good condition than in bad condition (Fig. 3C, D), thereby providing a temporal profile of parkinsonism in each individual patient.

These results thus suggest that analysis of power-law temporal auto-correlation of physical activity time series using the bi-directional extension (Ohashi et al., 2003) is applicable to patients with parkinsonism for the evaluation of motor dysfunction irrespective of the presence of tremor and may provide useful objective data necessary for the control of drug dosage in the out-patient clinic and also for the evaluation of new drugs for parkinsonism (Pan et al., 2007).

4. Evaluation of effects of traditional Chinese medicine on parkinsonian symptoms

Conventional antiparkinsonism drugs effectively ameliorate the symptoms of patients with PD during the initial several years of onset, but become increasingly less effective and induce motor fluctuations including wearing-off, on-off, dopa-induced dyskinesia, and agonist-induced sleep attack (Arnulf et al., 2002; Comella, 2002; Hobson et al., 2002; Ondo et al., 2001; Pahwa et al., 2006). PD patients not infrequently suffer from non-motor symptoms, such as neuropsychiatric symptoms, autonomic symptoms, gastrointestinal symptoms, sensory symptoms, non-motor fluctuations (autonomic symptoms, cognitive or psychiatric symptoms, sensory symptoms including pain), fatigue, and sleep disturbance (Chaudhuri & Schapira, 2009; Miyasaki et al., 2006; Park & Stacy, 2009), and these non-motor symptoms may be intrinsic to the disease pathology or may be the result of treatment with dopaminergic agents. Several studies have established that the non-motor symptoms of PD are common, occur across all stages of PD, and are a key determinant of quality of life (Chaudhuri & Schapira, 2009).

Herbal remedies have a long history of use (particularly in East Asian countries) for alleviating various symptoms and have been increasingly used as alternative medicines worldwide, including the United States (De Smet, 2002). Traditional Chinese medicines (TCM) ameliorate various symptoms, particularly the ageing-related symptoms, and hence are likely to be beneficial for chronic diseases such as PD (Iwasaki et al., 2004; 2005a; 2005b). Good compliance for long-term use with few side effects may be another merit of TCM suitable for patients with PD (Lian & Luo, 2007; Zhao et al., 2007).

In order to evaluate the effects of TCM on symptoms of parkinsonism, we evaluated the effects of Zeng-xiao An-shen Zhi-chan 2 (ZAZ2) on patients with PD using this method together with conventional scales for parkinsonism (Pan et al., 2011a). ZAZ2 granule is made up of 14 kinds of herbs; *Uncaria rhynchophylla* 10 g, *Rehmanniae radix* 10 g, *Cornus officinalis* 8 g, *Asnragus cochinchinensis* 10 g, *Paeonia lactiflora* 10 g, *Desertliving cistanche* 10 g, *Puerariae radix* 10 g, *Arisaema consanguineum* Schott 10 g, *Salviae Miltiorrhizae radix* 10 g, *Acorus tatarinowii* 10 g, *Curcuma longa* Linn 12 g, *Morindae officinalis radix* 10 g, *Rhizoma gastrodiae* 10 g, and *Rhizoma chuanxiong* 10 g. One hundred and fifteen patients with idiopathic PD took 8 g of either ZAZ2 granule or placebo granule that was not distinguished by appearance or taste for 13 weeks. Patients were randomly assigned to the ZAZ2 group (n=59) or placebo group (n=56). There was no difference in the mean age, gender ratio or disease duration between the ZAZ2 and placebo groups, and the post hoc test revealed no

significant baseline (week 0) differences in UPDRS scores, Hoehn & Yahr stages, mean counts, power-law temporal exponent α values, or in the dosage of antiparkinsonian drugs between the two groups. All the patients were evaluated at week 0, week 1, and week 13 for the actigraph recording, UPDRS and Secondary Symptom Score, which is conventionally used in China to evaluate the effects of antiparkinsonism drugs and consists of 8 parts, including the assessments of non-fluent speech, vertigo, insomnia/nightmares, headache, sweating or night sweats, tiredness, sense of cold, and dysuria (Long, 1992). The awake-time and sleep-time actigraph data were used separately for the power-law temporal analyses.

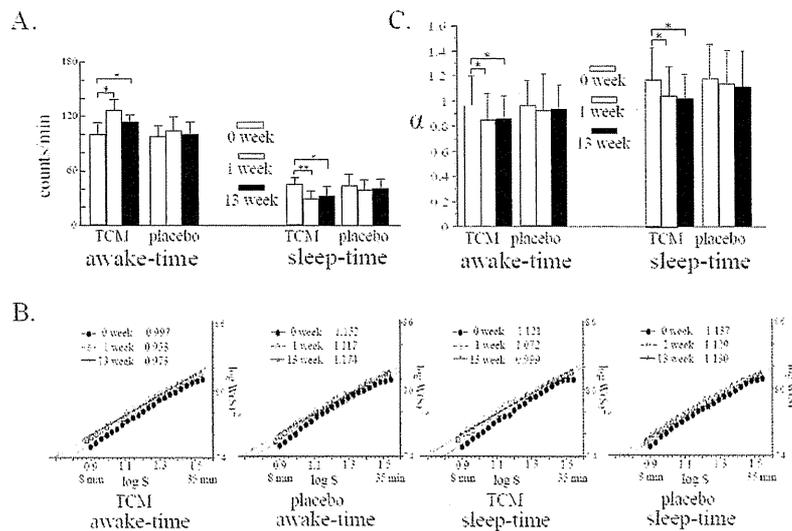


Fig. 5. Effects of TCM and placebo granules on actigraph recordings. (A) Counts of physical activity (mean \pm S.D.). (B) Average wavelet coefficients, as a function of the wavelet scale for awake-time and sleep-time. The slopes are power-law exponents α . (C) Power-law exponents α (mean \pm S.D.). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. (Pan et al., 2011a)

The local power-law exponent α values during both awake-time and sleep-time were significantly decreased after taking ZAZ2 granule, but not after taking placebo granule (Table 1, Fig 5). The average wavelet coefficients exhibited linear relationships in the range of scales from 8 min to 35 min both for the ZAZ2 and placebo groups (Fig. 5B). The local power-law exponent α values during both awake-time and sleep-time were significantly decreased both week 1 and 13 in the ZAZ2 group, but not in the placebo group (Table 1 and Fig 5C, $P < 0.01$; Bonferroni test). The beneficial effects of ZAZ2 were shown with UPDRS scores, as well; significant and persistent improvements were found in the scores of Part II, Part II + Part III, and Part IV (Table 1). These scores at week 13 were significantly different between the ZAZ2 group and the placebo group. As the exploratory outcome of this study, most of the secondary symptoms were improved after taking ZAZ2 granule, whereas only a few symptoms were transiently improved in the placebo group (Table 2).

We evaluated the beneficial effects of TCM specifically on sleep disturbance of patients with parkinsonism. We used placebo-controlled, randomized study design, in which 48 patients

	Placebo (n = 54)			TCM (n = 56)		
	Week 0	Week 1	Week 13	Week 0	Week 1	Week 13
UPDRS total score	46.6 ± 16.3	44.7 ± 15.3	45.9 ± 18.1	46.3 ± 17.1	37.1 ± 11.2 ^{##}	40.7 ± 15.1 [#]
UPDRS I	2.5 ± 0.7	2.3 ± 1.1	2.4 ± 1.2	2.6 ± 0.8	2.1 ± 0.7 [*]	2.3 ± 0.9
UPDRS II	15.7 ± 9.3	14.8 ± 11.2	15.3 ± 11.6	15.9 ± 11.3	12.5 ± 4.6 [#]	13.4 ± 9.8 [#]
UPDRS III	25.5 ± 12.9	23.8 ± 10.6 [*]	24.9 ± 12.7	25.4 ± 10.1	19.3 ± 9.8 [#]	21.6 ± 10.4 [*]
UPDRS IV	3.1 ± 1.1	2.9 ± 1.6	3.0 ± 1.4	3.2 ± 1.4	2.6 ± 0.8 [#]	2.7 ± 1.3 [#]
Awake-time (counts/min)	98.5 ± 14.1	102.6 ± 18.9	100.7 ± 16.9	99.8 ± 17.8	126.7 ± 13.4 ^{##}	118.4 ± 11.8 ^{##}
Sleep-time (counts/min)	42.9 ± 17.1	38.8 ± 15.6 [*]	40.1 ± 14.8	43.2 ± 11.6	35.6 ± 13.6 [#]	32.8 ± 13.6 [#]
α(awake-time)	0.97 ± 0.21	0.95 ± 0.28	0.96 ± 0.18	0.97 ± 0.24	0.88 ± 0.21 [*]	0.86 ± 0.19 ^{##}
α(sleep-time)	1.19 ± 0.28	1.16 ± 0.27	1.15 ± 0.29	1.18 ± 0.26	1.04 ± 0.22 [*]	1.02 ± 0.18 ^{##}

Data presented are mean ± SD. *: P < 0.05; **: P < 0.01 compared to week 0 (Repeated-measure ANOVAs).

#P < 0.05; ##P < 0.01 compared to placebo (Bonferroni test). UPDRS: Unified Parkinson's Disease Rating Scale.

α: power-law exponent.

Table 1. Measurements before and after taking test granules. (Pan et al., 2011a)

Group	Time	Non-fluent speech	Vertigo	Insomnia/nightmare	Headache	Sweating or night sweats	Tiredness	Sense of cold	Dysuria
TCM	week 0	1.08 ± 0.74	1.33 ± 0.83	2.77 ± 0.98	0.92 ± 0.56	2.11 ± 0.68	1.66 ± 0.57	1.90 ± 0.67	2.23 ± 0.69
	week 1	0.56 ± 0.28 [*]	0.84 ± 0.26 [#]	2.03 ± 0.78 [*]	0.64 ± 0.28 ^{##}	1.38 ± 0.69 [#]	1.21 ± 0.46 [*]	1.48 ± 0.57 [*]	1.43 ± 0.31 [#]
	week 13	0.65 ± 0.33 ^{##}	0.95 ± 0.37 [*]	1.73 ± 0.38 [#]	0.63 ± 0.19 [#]	1.48 ± 0.28 ^{##}	1.27 ± 0.51 [#]	1.58 ± 0.61	1.46 ± 0.36 ^{##}
Placebo	week 0	1.12 ± 0.59	1.31 ± 0.97	2.67 ± 0.87	1.03 ± 0.75	2.13 ± 1.32	1.70 ± 0.97	1.78 ± 0.39	2.29 ± 1.02
	week 1	0.69 ± 0.32 [*]	1.12 ± 0.69	2.40 ± 0.69 [*]	0.96 ± 0.36 [*]	1.87 ± 0.58	1.35 ± 0.69 [*]	1.39 ± 0.81	1.69 ± 0.92 [*]
	week 13	1.02 ± 0.36	1.28 ± 0.53	2.45 ± 0.38	0.99 ± 0.65	2.18 ± 0.56	1.58 ± 0.66	1.64 ± 0.58	2.18 ± 1.30

Data presented are mean ± SD. *: P < 0.05, **: P < 0.01 compared with 0 weeks (Repeated-measure ANOVAs).

#P < 0.05, ##P < 0.01 compared to placebo (Bonferroni test).

Table 2. Secondary symptom scores before and after taking test granules. (Pan et al., 2011a)

with idiopathic PD who had at least three awakenings per night occurring at least 3 nights per week participated. Patients wore the actigraph on the wrist of their non-dominant hand for seven consecutive days twice at week 0 (before) and week 6 of taking either one of the granule. For control, age-matched 25 patients with non-neurological diseases who had neither sleep disturbance nor parkinsonism wore the actigraph for seven consecutive days. Daily profiles of activity counts clearly demonstrated an improvement of the biological rhythm after the additional treatment in the TCM group but not in the placebo group (Fig. 6A). After treatment, sleep latency, median sleep efficiency and the median 5 least active hour, all of which were the parameters specifically reflected sleep disturbance (Pan et al., 2011b), shifted towards the values of the control group in the TCM group, but not in the placebo group (Fig 6B).

Scores in UPDRS Part II reflects the long-term outcome of the patients (Harrison et al., 2009). That both α-values for local maxima and the scores in UPDRS Part II, Part II + Part III and Part IV improved after TCM suggested that α-values for local maxima reflected patients' overall ADL, including motor symptoms and non-motor symptoms. Therefore, it is likely that analysis of the α-values is useful for the evaluation of drug effects on the long-term outcome of patient with PD (Pan et al., 2011a; 2011b).

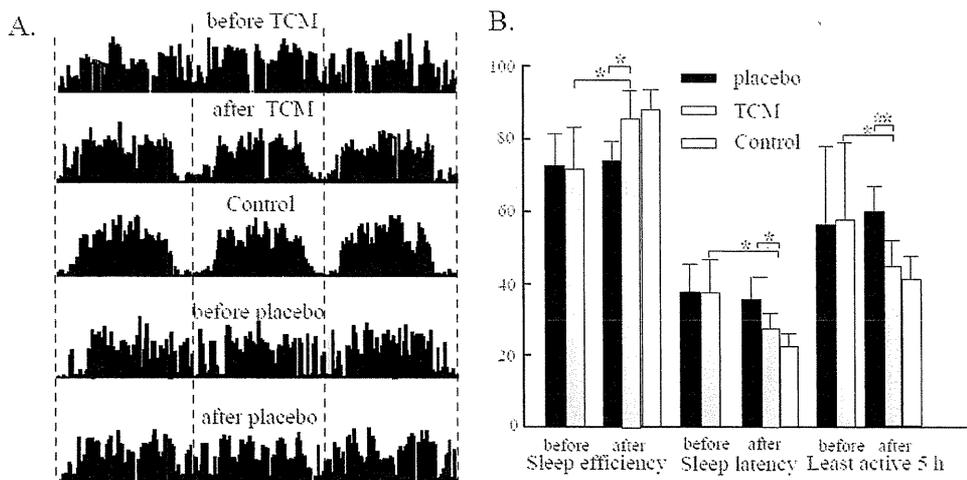


Fig. 6. Effects of cerebral granule (TCM). (A) Daily profiles of actigraph count for three consecutive days before and after taking TCM. Dashed line: midnight. (B) Changes from baseline in actigraph counts. Columns and bars (mean \pm S.D.) indicate sleep efficiency (%), sleep latency (min) and the 5 least active hours (counts/min). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. Reprinted with permission from (Pan et al., 2011b).

5. Assessment for effects of GVS for ameliorating parkinsonism

Enhancing neuronal transmission is a possible non-pharmacological therapeutic strategy for neurological diseases. The cranial nerves send direct inputs to the brain, and their stimulation may lead to alterations in various central functions. Such stimulation may potentially be a therapeutic strategy for brain disorders due to the low invasiveness as compared to deep brain stimulation. Considering its central connections, the vestibular nerve can influence limbic-to-motor functions, and we applied non-invasive and non-nociceptive noisy galvanic vestibular stimulation (GVS) to the patients with parkinsonism. We successfully improved parkinsonian symptoms by using noisy GVS at a low-frequency range targeting the vestibular nerves of patients with levodopa responsive PD and levodopa unresponsive parkinsonism (Yamamoto et al., 2005). This effect is presumably through the demonstrated vestibule-cerebellar connections, and input noise played the beneficial role in sensitizing neural systems, possibly through a mechanism known as stochastic resonance, a basic physical mechanism underlying noise-enhanced responses of nonlinear systems to weak signals. It is hypothesized that a central circuit signaling the onset of movement of which the threshold is relatively increased due to the diseases may benefit from noisy emulation of the afferent firing rates. We analyzed whether the beneficial effects of GVS on parkinsonism was reflected in a decrease of the α -value for local maxima.

As previously described (Yamamoto et al., 2005), a portable GVS device was used to deliver currents using a bilateral unipolar configuration, in which electrodes were placed over the patient's bilateral mastoid processes with the reference electrodes placed on the forehead. The waveform, a zero-mean, linearly detrended noisy current with a $1/f$ -type power

spectrum (Struzik et al., 2006) within a range of 0.01-2.0 Hz or a constant zero current for control, with a duration of 300 sec was continuously repeated during the tests. The magnitude of noisy GVS was set to 60% of each subject's nociceptive threshold (0.29 ± 0.20 mA). Then either the noisy GVS or the control zero current was continuously applied for the first 24 hours, and then switched to the counter-part and applied for another 24 hours, while the patients' wrist activity was monitored continuously for 48 hours. The order of noisy GVS and the control zero current was determined for each patient by random selection.

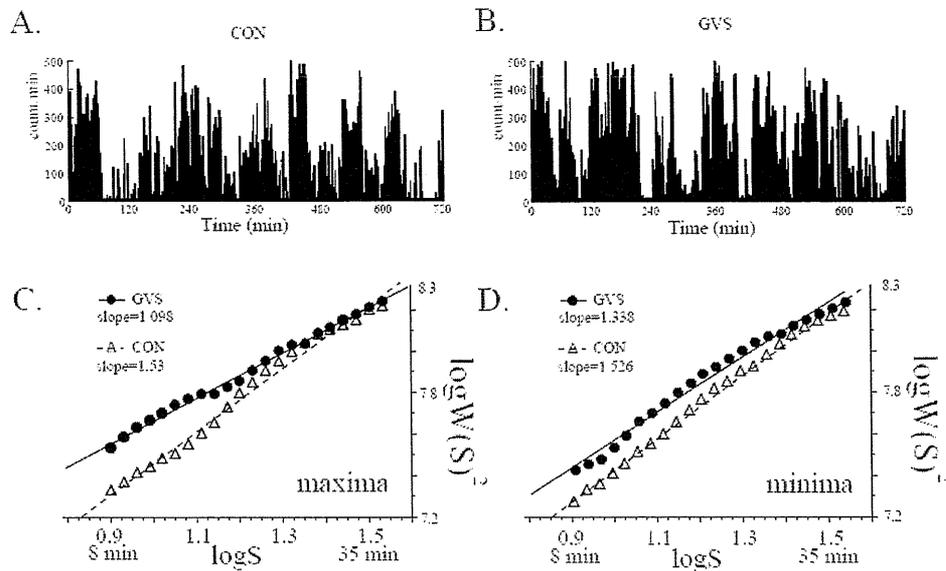


Fig. 7. Illustrative examples of wrist activity data of a PD patient during the control (CON) period (A) and during GVS application (B). The wavelet coefficients ($W(S)$) of these data, as a function of the wavelet scale (S) are shown for local maxima (C) and minima (D). The slopes are power-law exponents α . Reprinted with permission from (Pan et al., 2008).

The representative wrist activity data of a PD patient during the control period and during the application of GVS were shown in Fig. 7A, B. Compared to control, GVS was associated with more frequent switching between higher and lower levels of activity. This resulted in a higher wavelet power ($W(S)^2$) with GVS (Fig. 7C, D), particularly at smaller scales (S), or higher frequencies, for local maxima (Fig. 7C). The power-law exponent α , given by the slope of the $\log S$ vs. $\log W(S)^2$ relationship and characterizing the nature of switching patterns between high and low values in a statistical sense, was smaller with GVS than with control stimulation, especially for the local maxima (Fig. 7C, D).

The group average wavelet coefficients exhibited linear relationships in the range of scales (S) from 8 min to 35 min both for local maxima and minima and for GVS and control conditions (Fig. 8A, B). The slope for local maxima with noisy GVS was substantially less than that with control stimulation. For local maxima, the mean power-law exponent was significantly smaller for GVS than for the control (Fig. 8C). The difference in the mean α for local minima was much less than that for the local maxima. When the mean α -values for the

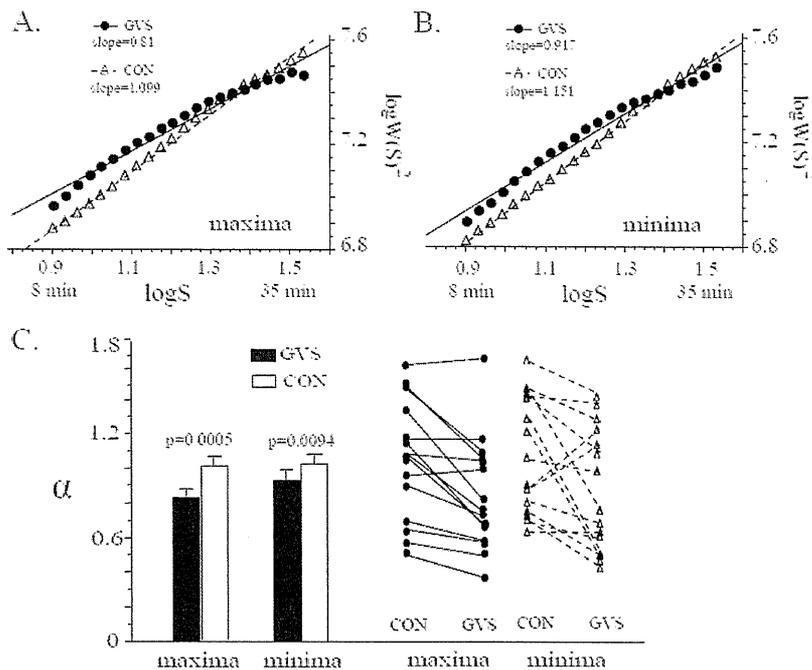


Fig. 8. The group average wavelet coefficients for local maxima (A) and minima (B) for GVS and control (CON) conditions. (C) Comparisons of the mean α for GVS and CON (left) and the within-individual differences (right). The error bars represent SEM. Reprinted with permission from (Pan et al., 2008).

first and the second days were compared, significant differences were not observed either for local maxima or minima, suggesting that the above differences were due to the GVS application itself, not to an order effect.

We confirmed that measurement of the mean α for local maxima detected the improvement of parkinsonism during GVS with sufficient sensitivity (Pan et al., 2008).

6. Conclusion

Analysis of patients' physical activity records collected by an actigraph device using power-law exponents probing temporal autocorrelation of the activity counts provides methods for the evaluation of disability resulting from motor and non-motor parkinsonism without being influenced by the presence of tremor or different patterns of daily living (Pan et al., 2007). Sufficient sensitivity and reliability of this method warrants the objectivity in the evaluation of symptom severity (Pan et al., 2008; Pan et al., 2011a), hence this method may be useful for the evaluation of disease progression and efficacy of new drug.

7. Acknowledgement

This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan to S.K.

8. References

- Arnulf, I., Konofal, E., Merino-Andreu, M., Houeto, J.L., Mesnage, V., Welter, M.L., Lacomblez, L., Golmard, J.L., Derenne, J.P. & Agid, Y. (2002). Parkinson's disease and sleepiness: an integral part of PD. *Neurology*, Vol. 58, No. 7, (Apr 2002), pp. 1019-1024, ISSN 0028-3878
- Chaudhuri, K.R. & Schapira, A.H. (2009). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol*, Vol. 8, No. 5, (May 2009), pp. 464-474, ISSN 1474-4422
- Comella, C.L. (2002). Daytime sleepiness, agonist therapy, and driving in Parkinson disease. *JAMA*, Vol. 287, No. 4, (Jan 2002), pp. 509-511, ISSN 0098-7484
- Comella, C.L., Morrissey, M. & Janko, K. (2005). Nocturnal activity with nighttime pergolide in Parkinson disease: a controlled study using actigraphy. *Neurology*, Vol. 64, No. 8, (Apr 2005), pp. 1450-1451, ISSN 1526-632X
- De Smet, P.A. (2002). Herbal remedies. *N Engl J Med*, Vol. 347, No. 25, (Dec 2002), pp. 2046-2056, ISSN 1533-4406
- Harrison, M.B., Wylie, S.A., Frysinger, R.C., Patrie, J.T., Huss, D.S., Currie, L.J. & Wooten, G.F. (2009). UPDRS activity of daily living score as a marker of Parkinson's disease progression. *Mov Disord*, Vol. 24, No. 2, (Jan 2009), pp. 224-230, ISSN 1531-8257
- Hobson, D.E., Lang, A.E., Martin, W.R., Razmy, A., Rivest, J. & Fleming, J. (2002). Excessive daytime sleepiness and sudden-onset sleep in Parkinson disease: a survey by the Canadian Movement Disorders Group. *JAMA*, Vol. 287, No. 4, (Jan 2002), pp. 455-463, ISSN 0098-7484
- Iwasaki, K., Kobayashi, S., Chimura, Y., Taguchi, M., Inoue, K., Cho, S., Akiba, T., Arai, H., Cyong, J.C. & Sasaki, H. (2004). A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of the Chinese herbal medicine "ba wei di huang wan" in the treatment of dementia. *J Am Geriatr Soc*, Vol. 52, No. 9, (Sep 2004), pp. 1518-1521, ISSN 0002-8614
- Iwasaki, K., Maruyama, M., Tomita, N., Furukawa, K., Nemoto, M., Fujiwara, H., Seki, T., Fujii, M., Kodama, M. & Arai, H. (2005a). Effects of the traditional Chinese herbal medicine Yi-Gan San for cholinesterase inhibitor-resistant visual hallucinations and neuropsychiatric symptoms in patients with dementia with Lewy bodies. *J Clin Psychiatry*, Vol. 66, No. 12, (Dec 2005), pp. 1612-1613, ISSN 0160-6689
- Iwasaki, K., Satoh-Nakagawa, T., Maruyama, M., Morima, Y., Nemoto, M., Tomita, N., Tanji, H., Fujiwara, H., Seki, T., Fujii, M., Arai, H. & Sasaki, H. (2005b). A randomized, observer-blind, controlled trial of the traditional Chinese medicine Yi-Gan San for improvement of behavioral and psychological symptoms and activities of daily living in dementia patients. *J Clin Psychiatry*, Vol. 66, No. 2, (Feb 2005), pp. 248-252, ISSN 0160-6689
- Jean-Louis, G., Mendlowicz, M.V., Gillin, J.C., Rapaport, M.H., Kelsoe, J.R., Zizi, F., Landolt, H. & von Gizycki, H. (2000). Sleep estimation from wrist activity in patients with major depression. *Physiol Behav*, Vol. 70, No. 1-2, (Jul 2000), pp. 49-53, ISSN 0031-9384
- Katayama, S. (2001). Actigraph analysis of diurnal motor fluctuations during dopamine agonist therapy. *Eur Neurol*, Vol. 46, No. Suppl 1, (2001), pp. 11-17, ISSN 0014-3022
- Korszun, A., Young, E.A., Engleberg, N.C., Brucksch, C.B., Greden, J.F. & Crofford, L.A. (2002). Use of actigraphy for monitoring sleep and activity levels in patients with fibromyalgia and depression. *J Psychosom Res*, Vol. 52, No. 6, (Jun 2002), pp. 439-443, ISSN 0022-3999
- Korte, J., Hoehn, T. & Siegmund, R. (2004). Actigraphic recordings of activity-rest rhythms of neonates born by different delivery modes. *Chronobiol Int*, Vol. 21, No. 1, (Jan 2004), pp. 95-106, ISSN 0742-0528

- Lian, X.F. & Luo, X.D. (2007). [Effect of TCM treatment according to syndrome differentiation in enhancing curative effect and reducing side-effect of madopa]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, Vol. 27, No. 9, (Sep 2007), pp. 796-799, ISSN 1003-5370
- Long, C. (1992). Definition and evaluation of parkinsonism in TCM. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine* Vol. 4, No. 15, (1992), pp. 39.
- Martinez-Martin, P., Gil-Nagel, A., Gracia, L.M., Gomez, J.B., Martinez-Sarries, J. & Bermejo, F. (1994). Unified Parkinson's Disease Rating Scale characteristics and structure. The Cooperative Multicentric Group. *Mov Disord*, Vol. 9, No. 1, (Jan 1994), pp. 76-83, ISSN 0885-3185
- Miyasaki, J.M., Shannon, K., Voon, V., Ravina, B., Kleiner-Fisman, G., Anderson, K., Shulman, L.M., Gronseth, G. & Weiner, W.J. (2006). Practice Parameter: evaluation and treatment of depression, psychosis, and dementia in Parkinson disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, Vol. 66, No. 7, (Apr 2006), pp. 996-1002, ISSN 1526-632X
- Mormont, M.C., Waterhouse, J., Bleuzen, P., Giacchetti, S., Jami, A., Bogdan, A., Lellouch, J., Misset, J.L., Touitou, Y. & Levi, F. (2000). Marked 24-h rest/activity rhythms are associated with better quality of life, better response, and longer survival in patients with metastatic colorectal cancer and good performance status. *Clin Cancer Res*, Vol. 6, No. 8, (Aug 2000), pp. 3038-3045, ISSN 1078-0432
- Nakamura, T., Kiyono, K., Yoshiuchi, K., Nakahara, R., Struzik, Z.R. & Yamamoto, Y. (2007). Universal scaling law in human behavioral organization. *Phys Rev Lett*, Vol. 99, No. 13, (Sep 2007), pp. 138103, ISSN 0031-9007
- Ohashi, K., Nunes Amaral, L.A., Natelson, B.H. & Yamamoto, Y. (2003). Asymmetrical singularities in real-world signals. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, Vol. 68, No. 6 Pt 2, (Dec 2003), pp. 065204, ISSN 1539-3755
- Okawa, M., Mishima, K., Hishikawa, Y. & Hozumi, S. (1995). [Rest-activity and body-temperature rhythm disorders in elderly patients with dementia--senile dementia of Alzheimer's type and multi-infarct dementia]. *Rinsho Shinkeigaku*, Vol. 35, No. 1, (Jan 1995), pp. 18-23, ISSN 0009-918X
- Ondo, W.G., Dat Vuong, K., Khan, H., Atassi, F., Kwak, C. & Jankovic, J. (2001). Daytime sleepiness and other sleep disorders in Parkinson's disease. *Neurology*, Vol. 57, No. 8, (Oct 2001), pp. 1392-1396, ISSN 0028-3878
- Pahwa, R., Factor, S.A., Lyons, K.E., Ondo, W.G., Gronseth, G., Bronte-Stewart, H., Hallett, M., Miyasaki, J., Stevens, J. & Weiner, W.J. (2006). Practice Parameter: treatment of Parkinson disease with motor fluctuations and dyskinesia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, Vol. 66, No. 7, (Apr 2006), pp. 983-995, ISSN 1526-632X
- Pan, W., Kwak, S., Liu, Y., Sun, Y., Fang, Z., Qin, B. & Yamamoto, Y. (2011a). Traditional Chinese medicine improves nocturnal activity in Parkinson's disease. *Parkinson's disease*, in press. doi:10.4061/2011/789506,ISSN 2042-0080
- Pan, W., Liu, Y., Fang, Z., Zhu, X., Kwak, S. & Yamamoto, Y. (2011b). A compound belonging to traditional Chinese medicine improves nocturnal activity in Parkinson's disease. *Sleep Med*, Vol. 12, No. 3, (Mar 2011), pp. 307-308, ISSN 1878-5506
- Pan, W., Ohashi, K., Yamamoto, Y. & Kwak, S. (2007). Power-law temporal autocorrelation of activity reflects severity of parkinsonism. *Mov Disord*, Vol. 22, No. 9, (Jul 2007), pp.1308-1313, ISSN 1531-8257

- Pan, W., Soma, R., Kwak, S. & Yamamoto, Y. (2008). Improvement of motor functions by noisy vestibular stimulation in central neurodegenerative disorders. *J Neurol*, Vol. 255, No. 11, (Nov 2008), pp. 1657-1661, ISSN 0340-5354
- Park, A. & Stacy, M. (2009). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *J Neurol*, Vol. 256, No. Suppl 3, (Aug 2009), pp. 293-298, ISSN 1432-1459
- Peng, C.K., Havlin, S., Stanley, H.E. & Goldberger, A.L. (1995). Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. *Chaos*, Vol. 5, No. 1, (1995), pp. 82-87, ISSN 1054-1500
- Sekine, M., Akay, M., Tamura, T., Higashi, Y. & Fujimoto, T. (2004). Fractal dynamics of body motion in patients with Parkinson's disease. *J Neural Eng*, Vol. 1, No. 1, (Mar 2004), pp. 8-15, ISSN 1741-2560
- Struzik, Z.R., Hayano, J., Sakata, S., Kwak, S. & Yamamoto, Y. (2004). 1/f scaling in heart rate requires antagonistic autonomic control. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, Vol. 70, No. 5, (Nov 2004), pp. 050901, ISSN 1539-3755
- Struzik, Z.R., Hayano, J., Soma, R., Kwak, S. & Yamamoto, Y. (2006). Aging of complex heart rate dynamics. *IEEE Trans Biomed Eng*, Vol. 53, No. 1, (Jan 2006), pp. 89-94, ISSN 0018-9294
- Teicher, M.H. (1995). Actigraphy and motion analysis: new tools for psychiatry. *Harv Rev Psychiatry*, Vol. 3, No. 1, (May-Jun 1995), pp. 18-35, ISSN 1067-3229
- Tuisku, K., Holi, M.M., Wahlbeck, K., Ahlgren, A.J. & Lauerma, H. (2003). Quantitative rest activity in ambulatory monitoring as a physiological marker of restless legs syndrome: a controlled study. *Mov Disord*, Vol. 18, No. 4, (Apr 2003), pp. 442-448, ISSN 0885-3185
- van Someren, E.J., Hagebeuk, E.E., Lijzenga, C., Scheltens, P., de Rooij, S.E., Jonker, C., Pot, A.M., Mirmiran, M. & Swaab, D.F. (1996). Circadian rest-activity rhythm disturbances in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, Vol. 40, No. 4, (Aug 1996), pp. 259-270, ISSN 0006-3223
- van Someren, E.J., Pticek, M.D., Speelman, J.D., Schuurman, P.R., Esselink, R. & Swaab, D.F. (2006). New actigraph for long-term tremor recording. *Mov Disord*, Vol. 21, No. 8, (Aug 2006), pp. 1136-1143, ISSN 0885-3185
- van Someren, E.J., van Gool, W.A., Vonk, B.F., Mirmiran, M., Speelman, J.D., Bosch, D.A. & Swaab, D.F. (1993). Ambulatory monitoring of tremor and other movements before and after thalamotomy: a new quantitative technique. *J Neurol Sci*, Vol. 117, No. 1-2, (Jul 1993), pp. 16-23, ISSN 0022-510X
- van Someren, E.J., Vonk, B.F., Thijssen, W.A., Speelman, J.D., Schuurman, P.R., Mirmiran, M. & Swaab, D.F. (1998). A new actigraph for long-term registration of the duration and intensity of tremor and movement. *IEEE Trans Biomed Eng*, Vol. 45, No. 3, (Mar 1998), pp. 386-395, ISSN 0018-9294
- Witting, W., Kwa, I.H., Eikelenboom, P., Mirmiran, M. & Swaab, D.F. (1990). Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, Vol. 27, No. 6, (Mar 1990), pp. 563-572, ISSN 0006-3223
- Yamamoto, Y., Struzik, Z.R., Soma, R., Ohashi, K. & Kwak, S. (2005). Noisy vestibular stimulation improves autonomic and motor responsiveness in central neurodegenerative disorders. *Ann Neurol*, Vol. 58, No. 2, (Aug 2005), pp. 175-181, ISSN 0364-5134
- Zhao, H., Li, W.W. & Gao, J.P. (2007). [Clinical trial on treatment of Parkinson's disease of Gan-Shen yin deficiency type by recipe for nourishing Gan-Shen]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, Vol. 27, No. 9, (Sep 2007), pp. 780-784, ISSN 1003-5370

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の基礎研究

ADAR2 発現低下と孤発性 ALS

ひ で や ま た く と かく
日 出 山 拓 人^{1,2)}, 郭

しん
伸¹⁾

1) 東京大学大学院医学系研究科神経内科 (〒113-8654 東京都文京区本郷7-3-1)
E-mail: HIDEYAMAT-INT@h.u-tokyo.ac.jp
2) 東京大学保健・健康推進本部

SUMMARY

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は 90% 以上が孤発性である。我々は、少数例の孤発性 ALS 剖検組織の検討から、ALS の運動ニューロンでは、AMPA 受容体のサブユニットである GluA2 が正常では RNA 編集されるべき Q/R 部位が未編集のものが発現していることを発見した。この GluA2 Q/R 部位の RNA 編集は adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) により特異的に触媒され、運動ニューロン特異的 ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスを作製した結果、ADAR2 活性低下による GluA2 Q/R 部位 RNA 編集低下が原因で神経細胞死を引き起こされることがわかった。今回、約 30 例のさまざまな病型の孤発性 ALS 患者剖検組織を解析し、孤発性 ALS の運動ニューロンには病型を問わず未編集型 GluA2 が発現していること、その原因が ADAR2 発現低下に依る活性低下であること、ALS の運動ニューロンには preclinical な段階から ADAR2 発現が低下している分子異常が認められることを見出したので紹介したい。

I. AMPA 受容体を介した神経細胞死

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は 90% 以上が孤発性であり、有効な治療法の開発が切望されている神経難病である。発症の原因は不明であるが、現在最も有力な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。特に AMPA 受容体を介する神経細胞死が ALS に関係する。AMPA 受容体を介する神経細胞死は、チャンネルからの過剰な Ca^{2+} 流入に引き続いて起こる。また、AMPA 受容体は GluA1-4 (GluR1-4) の 4 種のサブユニットからなる 4 量体で、 Ca^{2+} 透過性は GluA2 サブユニットが含まれるかどうかにより決まる。GluA2 を 1 個以上含む AMPA 受容体は Ca^{2+} 非透過性で、1 個も含まないものは Ca^{2+} 透過性である。ただし、GluA2 は転写後に Q/R (グルタミン/アルギニン) 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 GluA2 を含む AMPA 受容体も Ca^{2+} 透過性である。しかし、正常哺乳類では、脊髄運動ニューロンは全て編集型の GluA2 を発現し、 Ca^{2+} 透過性は細胞の生命維持に関わるので、厳密に制御されている。

II. ADAR2 活性と GluA2 Q/R 部位の RNA 編集

GluA2 Q/R 部位の RNA 編集は mRNA のアデノシ

ALS
AMPA 受容体
GluR2 (GluA2)
RNA 編集
ADAR2
ノックアウトマウス

ン・イノシン置換 (AI 編集) により CAG コドン (Q) が CIG=CGG コドン (R) に変わることによるアミノ酸置換を伴う。AI 編集は adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) により触媒される。哺乳類では ADAR は 3 種 (ADAR1, 2, 3) が知られているが, GluA2 Q/R 部位の RNA 編集は ADAR2 によって触媒されることがノックアウトマウスの検討から明らかにされている¹⁾。ADAR2 活性が低下すると AMPA 受容体サブユニットである GluA2 の Q/R 部位における AI 編集が行われなくなり, 未編集型の GluA2 が発現する。未編集型 GluA2 をサブユニットに持つ AMPA 受容体はカルシウム透過性が高く, 生理的にはニューロンには発現していない。そのため, 未編集型 GluA2 の発現は神経細胞死を引き起こす分子変化であることが動物実験から示されている¹⁻³⁾。

孤発性 ALS 患者の剖検脊髄の検討では, 半数以上の運動ニューロンにおける ADAR2 免疫染色性の低下⁴⁾, 前角組織では ADAR2 活性を規定する因子の一つである ADAR2 mRNA 発現量の減少が認められていた⁵⁾。ラットの一過性脳虚血実験では海馬 CA1 錐体細胞で ADAR2 mRNA 発現が低下し, GluA2 Q/R 部位 RNA 編集低下が起こり, 遅発性神経細胞死が生じ, 同部位の RNA 編集を回復することで細胞死が回避されることが報告されている⁶⁾。また全身的 ADAR2 ノックアウトマウスは, 脳の GluA2 Q/R 部位の RNA 編集率が著減し, 痙攣重積で死亡するが, GluA2 遺伝子を編集型 GluA2 をコードする遺伝子 GluR-B(R) に置換することにより正常化する¹⁾。ただし, この全身ノックアウトマウスは痙攣死であり, 脊髄運動ニューロンの神経細胞死を確認出来なかった。

以上より, 孤発性 ALS は, ADAR2 活性低下により GluA2 Q/R 部位の RNA 編集が低下することで神経細胞死が生じる, という仮説を立て, 私たちはコンディショナルノックアウトマウスを作製した。

ADAR2 遺伝子の活性基をコードするエクソンを LoxP で挟んだ変異マウス (ADAR2^{fllox/fllox}) を作製した (図 1A), 小胞性アセチルコリントランスポーター/アセチルコリン転換酵素のプロモータにより Cre recombinase をおよそ半数の運動ニューロンに発現する変異マウス (VChT-Cre.Fast)⁷⁾ との交配により, ADAR2^{fllox/fllox}/VChT-Cre.Fast (以下 AR2 マウス)

を Cre-LoxP 系を用いて作製した³⁾。この AR2 マウスは, 運動機能が緩徐進行性に低下し (図 1B, C), 有意な生存期間の短縮がみられた (図 1D)。また, 運動ニューロンの変性像およびニューロン数の減少, 脊髄前根においては有髄神経の変性と脱落が Cre の発現時期および発現頻度に一致して認められた (図 1E)。さらに, 運動性脳神経核では, いずれにおいても GluA2 Q/R 部位の編集率低下を認め, 顔面神経核, 舌下神経核のニューロンは神経細胞の脱落を脊髄運動ニューロン同様に認めたが, 動眼神経核においては, 編集率は低下しているにも関わらず, 神経細胞死は認めず, 孤発性 ALS の臨床像に類似した (図 1F)³⁾。さらに, この神経細胞死が未編集型 GluA2 のみによるかどうかを検討するために, ゲノムレベルで GluA2 Q/R 部位に R を発現するように操作した人工的な遺伝子を導入した GluR-B^{R/R} マウス⁸⁾ と AR2 マウスを交配し, ADAR2 活性のないニューロンにおいても編集型 GluA2 を発現する変異マウス (AR2res) を作製した。その結果, AR2res マウスの運動機能の低下はみられず, ADAR2 を発現しない運動ニューロンにも変性が生じなかった (図 1E)。このことは, ADAR2 活性低下による運動ニューロン死は, 未編集型 GluA2 の発現による AMPA 受容体の Ca²⁺ 透過性亢進を通じてのものであり, GluA2 Q/R 部位以外の ADAR2 編集部位は細胞死に関与しないことを示している (図 1G)³⁾。

この結果の重要な点は, ADAR2 遺伝子のノックアウトにより, 運動ニューロン死が起こること, その細胞死が内因性 GluA2 遺伝子を編集型 GluA2 を発現する変異遺伝子と置換することにより阻止されることから, 細胞障害性の本質は, 未編集型 GluA2 の発現が運動ニューロン死の直接原因である, ということが証明されたことである。さらに, AR2 マウスの検討から, 未編集型 GluA2 が発現するにも関わらず眼球運動を司る運動ニューロンが保たれるといった (ALS の眼球運動が終末期まで保たれることに相同), 同じ運動ニューロンでも部位により, 細胞死の選択性があることが判明した。この結果は, 孤発性 ALS では ADAR2 活性低下による GluA2 Q/R 部位の編集率低下が運動ニューロン死の直接原因であるという仮説⁹⁾ を支持する。

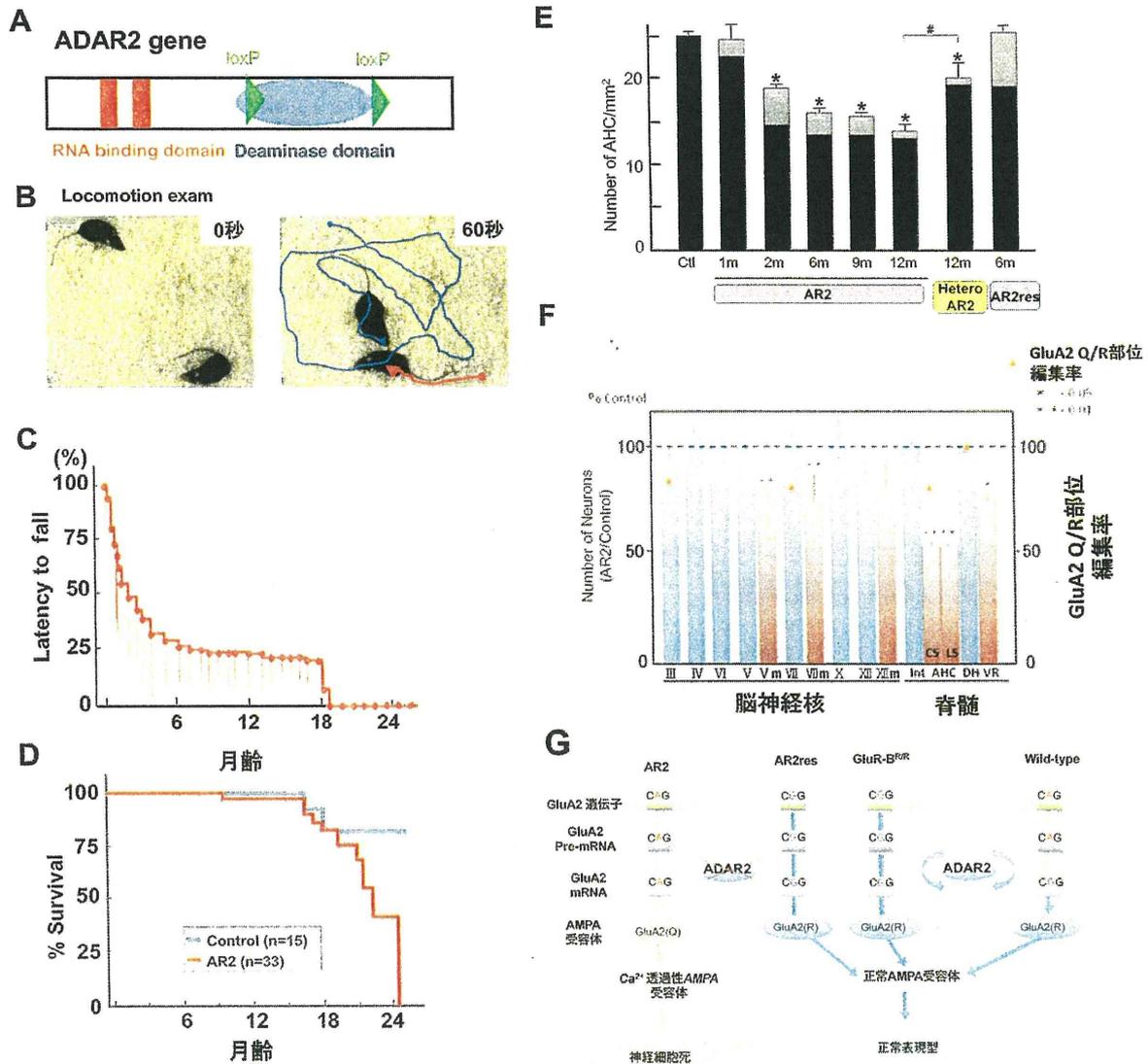


図1 ADAR2 コンディショナルノックアウトマウス

A: ADAR2は、2個の2本鎖RNA結合部位(double-stranded RNA binding motifs: ds RBMs)と1ヶ所の編集触媒部位(catalytic domain)からなる。ADAR2遺伝子のcatalytic domainをコードするエクソンをLoxPで挟んだ変異マウス(ADAR2^{loxP/loxP})を複製し、VChT-Cre.Fastマウスとの交配により、ADAR2^{loxP/loxP}/VChT-Cre.Fast(AR2マウス)をCre-LoxP系を用いて複製した。

B: 12ヵ月齢では、同胞のADAR2^{loxP/loxP}マウスの表現型は活動性が正常(青ライン)であるのに対して、AR2マウスでは、後肢および尾、背筋の筋萎縮といった姿勢の異常が認められ、運動量が著減している(赤ライン)ことが観察された。

C: ロータロッドは正常対照15匹、AR2マウス33匹に対して、毎週、10rpmで180秒を最大値とし、3回施行した最大値と比較した。赤のプロットは、正常対照を100%とした際のAR2マウスの落下までの時間である。5週目からAR2マウスのロータロッドスコアは著減した。

D: 生存期間は、正常対照(n=15匹)(青ライン)、AR2マウス(n=33匹)(赤ライン)が、105.1 ± 13.5週(mean ± SEM)に対して、AR2マウスは、81.5 ± 16.4週と短縮していた(p = 0.0262, Log-rank analysis)。

E: 脊髄前角大径運動ニューロンの特異的マーカーである、SMI32とADAR2の二重免疫染色を行い、正常対照(Ctl)、1、2、6、9、12ヵ月齢(1m、2m、6m、9m、12m)のAR2マウスについてSMI32陽性、ADAR2陽性の運動ニューロン数(黒カラム)、SMI32陽性、ADAR2陰性の運動ニューロン数(灰色カラム)をカウントした。正常対照では全ての脊髄前角大径運動ニューロンは、SMI32陽性、ADAR2陽性であったが、AR2マウスでは1ヵ月齢から、Creの発現に一致し、ADAR2陰性の運動ニューロンが観察され、経時的にこれらのCreの発現する約半数のADAR2陰性の運動ニューロンが変性脱落した(*p < 0.01, repeated ANOVA)。また、HeteroAR2(heterozygous ADAR2^{loxP/loxP}/VChT-Cre)マウスにおいてわずかな未編集型GluA2の発現による神経細胞死が生じた(p < 0.01, Mann-Whitney U検定)、さらに、GluR-B^{R/R}マウスとAR2マウスを交配し(本文参照)、

ADAR2 活性のないニューロンにおいても編集型 GluA2 を発現する変異マウス (AR2res) を作製した結果, ADAR2 を発現しない運動ニューロンにも変性が生じなかった。

F: 縦軸の左側は, AR2 マウスのニューロン数を Ctl 正常対照マウスのニューロン数を 100% として表した数値である。縦軸の右側は, GluA2 Q/R 部位編集率である。運動性脳神経核 (III, VII) では, いずれにおいても GluA2 Q/R 部位の編集率低下 (橙三角) を認め, 顔面神経核 (VIIIm), 舌下神経核 (XII) のニューロンは神経細胞の脱落を脊髄運動ニューロン (C5: 第 5 頸髄, L5: 第 5 腰髄) 同様に認めた (赤カラム) が, 動眼神経核においては, 編集率は低下しているにもかかわらず, 神経細胞死は認めなかった。脳神経系核: III (動眼神経核), IV (滑車神経核), V (三叉神経核), Vm (三叉神経運動性核), VII (顔面神経核), VIIIm (顔面神経運動性核), X (迷走神経核), XII (舌下神経核), XIIIm (舌下神経運動性核), Int (脊髄介在ニューロン), AHC (脊髄前角組織), C5 (第 5 頸髄), L5 (第 5 腰髄), DH (脊髄後角組織), VR (脊髄前根 L5)。* < 0.05, ** < 0.01, いずれも Mann-Whitney U 検定。

G: 野生型マウスでは, ADAR2 により, GluA2 Q/R 部位の RNA 編集が正常に行われ, 編集型の GluA2 (R) が発現し, 野生型の Ca^{2+} を透過しない AMPA 受容体が運動ニューロンに発現し, 正常の表現型を示す。AR2 マウスは, ADAR2 ノックアウトにより, GluA2 Q/R 部位の RNA 編集が行われず, 未編集型の GluA2 (Q) が発現し, Ca^{2+} 透過性の AMPA 受容体が運動ニューロンに発現し, 緩徐進行性の神経細胞死を来す。AR2res マウスでは, ADAR2 活性はないが, 編集型 GluA2 (R) が発現し, Ca^{2+} 非透過性の AMPA 受容体が運動ニューロンに発現し, 正常の表現型を示した。以上から, ADAR2 活性低下による運動ニューロン死は, GluA2 Q/R 部位以外の ADAR2 編集部位は細胞死に関与しない, 未編集型 GluA2 の発現による AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性亢進により生じたと考えられた。

III. 孤発性 ALS にユニバーサルな分子異常である GluA2 編集異常

さらに, 私たちのグループは少数例の検討から, laser microdissector を用いて凍結剖検脊髄組織から単一運動ニューロンを切り出し, 孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンの単一神経細胞レベルおよび脊髄前角組織レベル¹⁰⁾ の検討において, 部位選択的・疾患特異的に GluA2 Q/R 部位の編集率が低下していること, しかし GluA2 mRNA 発現量には有意な変化がないこと¹¹⁾, を確認した¹²⁾。この分子変化の疾患特異性, 部位選択性を検討し, 孤発性 ALS で変性しない小脳プルキンエ細胞の他, ささまざまな神経変性疾患における変性部位, すなわち, 小脳を侵す神経変性疾患である脊髄小脳変性症のプルキンエ細胞¹²⁾, ハンチントン病の線条体, アルツハイマー病の大脳皮質などにおいて, この部位の RNA 編集が保たれていることを明らかにした¹³⁾。さらに運動ニューロンに変性を生じるトリプレット・リピート病である球脊髄性筋萎縮症の運動ニューロンと家族性 ALS で最も頻度が高い SOD1 関連性家族性 ALS (ALS1) の運動ニューロンでも GluA2 Q/R 部位の RNA 編集には変化がないことを明らかにし¹⁴⁾, この分子変化が運動ニューロン死に伴う非特異的な変化である可能性を否定した。

今回, この分子異常が孤発性 ALS の病因に果たす意義を明らかにするために, 多発例の孤発性 ALS において, 運動ニューロンにおける未編集型 GluA2 の発現, ADAR2 の発現レベルおよび活性の変化を検

討した。孤発性 ALS 29 例 (古典型, 進行性球麻痺, ALS 痴呆, Basophilic inclusion body のみられる ALS を含む), 正常対照 6 例, 疾患対照 (多系統萎縮症) 5 例の凍結脊髄剖検組織を用いた。脊髄前角および運動ニューロンをレーザーダイセクターで切り出し, 回収した前角組織および単一脊髄運動ニューロンより総 RNA を抽出し, RT-PCR により cDNA を得た。得られた cDNA を用いて RNA 編集酵素 ADAR1, ADAR2, ADAR3 の mRNA を定量し, 各 ADARs により特異的に触媒される RNA 編集部位の編集率を算定し, 孤発性 ALS 群, 正常群, 疾患対照群の 3 群間で比較した。

その結果, 正常および疾患対照脊髄前角組織の GluA2 Q/R 部位の RNA 編集率はほぼ 100% であったが, 孤発性 ALS では全例で 100% 未満に低下していた (Mann-Whitney U 検定, $p < 0.001$) (図 2A)。なお, 病型, 発症年齢, 臨床経過での有意差はなかった。運動ニューロン組織の検討では, 正常および疾患対照群, 検索した全ての運動ニューロンにおいて GluA2 Q/R 部位の RNA 編集率は例外なく 100% であった (図 2B)。その一方で ALS 群の全例で, 未編集型 GluA2 を発現する運動ニューロンが検出され, いくつかの運動ニューロンの編集率は 0% であった (図 2B)。

また, RNA 編集酵素 ADAR2 の GluA2 Q/R 部位以外の特異的な基質である cytoplasmic fragile X mental retardation protein interacting protein 2 (CY-FIP2) K/E 部位における編集率は, ALS 群の前角組織 ($p < 0.03$) および運動ニューロン ($p < 0.005$) で

特集1 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の基礎研究

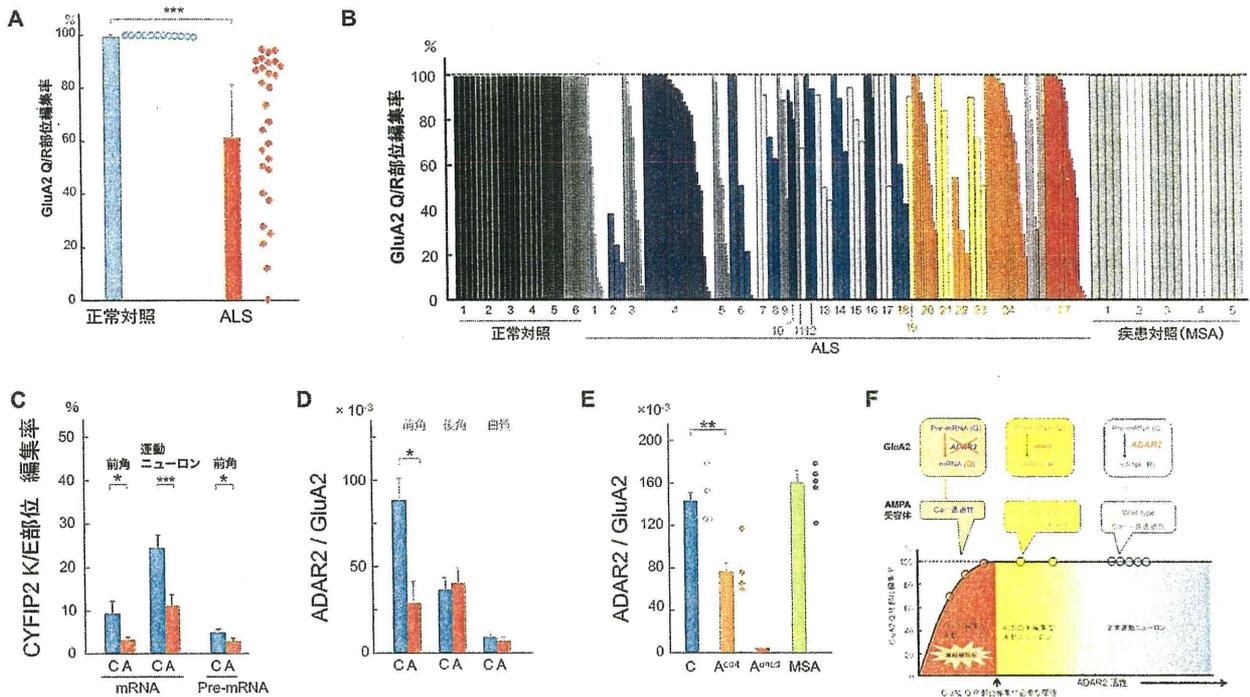


図2 孤発性ALSとADAR2活性低下

A: 正常 (n=12) および疾患対照脊髄前角組織 (n=29) の GluA2 Q/R 部位の RNA 編集率はほぼ 100% であったが、孤発性 ALS では全例で 100% 未満に低下していた (Mann-Whitney U 検定, 正常対照の編集率 $99.4\% \pm 0.7\%$ に対して孤発性 ALS は $61.0\% \pm 22.7\%$, $***p < 0.001$).

B: 縦軸は, GluA2 Q/R 部位の RNA 編集率, 横軸の数字は各症例を指す. 運動ニューロン組織の検討では, 正常 (6 例) および疾患対照群 (MSA: 多系統萎縮症, 6 例), 検索した全ての運動ニューロンにおいて GluA2 Q/R 部位の RNA 編集率は例外なく 100% であった. その一方で ALS 群の全例 (青色系カラム: 四肢型, 黄色系カラム: 球麻痺型, 桃色系カラム: ALS 痴呆, 赤カラム: Basophilic inclusion body 封入体を有する若年 ALS 例) で例外なく, 未編集型 GluA2 を発現する運動ニューロンが検出された. 細いカラムはシングルセル 1 個, 太いカラムはシングルセル 30 個の結果である.

C: ADAR2 の GluA2 Q/R 部位以外の特異的な基質である cytoplasmic fragile X mental retardation protein interacting protein 2 (CYFIP2) K/E 部位における編集率は, ALS 群 (A) の前角組織 (Mann-Whitney U 検定, $*p < 0.03$) および運動ニューロン (Mann-Whitney U 検定, $***p < 0.005$) で正常対照 (C) に比較し, 有意に低下しており, GluA2 pre-mRNA Q/R 部位の編集率も ALS 群の前角組織で有意に低下していた (Mann-Whitney U 検定, $p < 0.01$).

D: ADAR2 mRNA の発現レベルは, ALS 群 (A) の後角および白質では, 正常対照 (C) と同レベルであったが, 前角組織では正常対照の 1/3 に低下していた (Mann-Whitney U 検定, $*p < 0.05$).

E: 運動ニューロンにおける ADAR2 mRNA の発現レベルは, 正常対照群 (C) と疾患対照群 (MSA: 多系統萎縮症) との間には有意差がなかったが, 孤発性 ALS の編集型 GluA2 のみを発現する運動ニューロン (A^{edi}) においても有意な活性低下がみられた (Mann-Whitney U 検定, $**p < 0.02$). ALS 群の未編集型を発現する運動ニューロン (A^{uned}) では, 編集型 (A^{edi}) のみを発現する運動ニューロンに比してもさらに著減していた. ALS の編集型運動ニューロンですでに ADAR2 活性が低下していることははじめての発見であり, 編集が保たれていても既に疾患発症前状態になっていると考えられた.

F: 縦軸は, GluA2 Q/R 部位編集率で, 横軸は ADAR2 活性を表す. 正常 (青の部分) は, ADAR2 活性が十分あり, 編集型 GluA2 を有する Ca^{2+} 非透過性の正常 AMPA 受容体を発現している. しかし, ALS 発症準備状態に入ると ADAR2 活性が下がり始め (黄の部分), ある閾値を超えると確率的に death cascade に陥り (赤の部分), 未編集型 GluA2 を有した Ca^{2+} 透過性の AMPA 受容体を発現し, 神経細胞死に陥る.

有意に低下しており, GluA2 pre-mRNA Q/R 部位の編集率も ALS 群の前角組織で有意に低下しており ($p < 0.01$) (図 2C), ADAR2 活性低下を反映していた.

ADAR2 活性を規定する因子の 1 つである ADAR2 mRNA の発現レベルは, ALS の後角および白質では, 正常対照と同レベルであったが, 前角組織では正常対

照の 1/3 に低下していた ($p < 0.05$) (図 2D). さらに, 運動ニューロンにおける ADAR2 mRNA の発現レベルは, 正常対照群と疾患対照群との間には有意差がなかったが, 孤発性 ALS の編集型 GluA2 のみを発現する運動ニューロンにおいても有意な活性低下がみられた ($p < 0.02$) (図 2E). ALS 群の未編集型を発現す

る運動ニューロンでは、編集型のみを発現する運動ニューロンに比してもさらに著減していた (図 2E). ALS の編集型運動ニューロンですでに ADAR2 活性が低下していることは驚くべき結果で、編集が保たれていても既に疾患発症前状態になっていると考えられた (図 2F)¹⁷⁾.

ADAR2 の isozyme である ADAR1 は活性レベル (GluA2 R/G 部位編集率, Bladder cancer associated protein (BLCAP) Y/C 部位編集率) および mRNA 発現とも、編集型 GluA2 のみを発現する運動ニューロンにおいても ALS 群での変化はなかった¹⁷⁾. さらに、ADAR3 mRNA 発現量についても正常対照群と有意差はなかった¹⁷⁾. ADAR2 同様 A-to-I 変換を触媒する ADAR1, ADAR3 は過剰発現系では、競合的 inhibitor になり得る報告があったが^{15, 16)}, 今回の検討から、ADAR2 の活性低下が発現低下によるものであり、ADAR1 や ADAR3 との相互作用による影響は関与していないと考えられた. また、ADAR2 遺伝子発現の低下が、非特異的遺伝子発現低下を反映したものではなく、特異的な分子メカニズムにより引き起こされていることを示唆している。

これまで、孤発性 ALS 運動ニューロンに疾患特異的に GluA2 Q/R 部位の編集異常が生じていることを私たちは示してきたが^{10, 12)}, その検討は 10 例前後の少数例のものであった. 今回の多数例での共通した結果から、この分子異常が、孤発性 ALS に共通する分子異常であることが判明した¹⁷⁾. さらに、その原因が、運動ニューロンにおける GluA2 Q/R 部位を触媒する ADAR2 活性低下によることが ADAR2 の特異基質における RNA 編集率の低下と ADAR2 mRNA 発現量の低下から明らかになった. 孤発性 ALS 運動ニューロンにおける ADAR2 発現レベルの低下は、免疫組織化学的に確かめられた ADAR2 タンパクの発現低下⁴⁾とも合致する. 今回の結果は、ADAR2 活性低下が ADAR2 発現の低下によりもたらされ、タンパク分解の亢進によるものではないことを示している. したがって、ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスの結果と合わせると、孤発性 ALS に見出されている GluA2 の RNA 編集異常は神経細胞死の直接原因であり、ADAR2 活性低下が病因的意義を持っている可能性が高い。

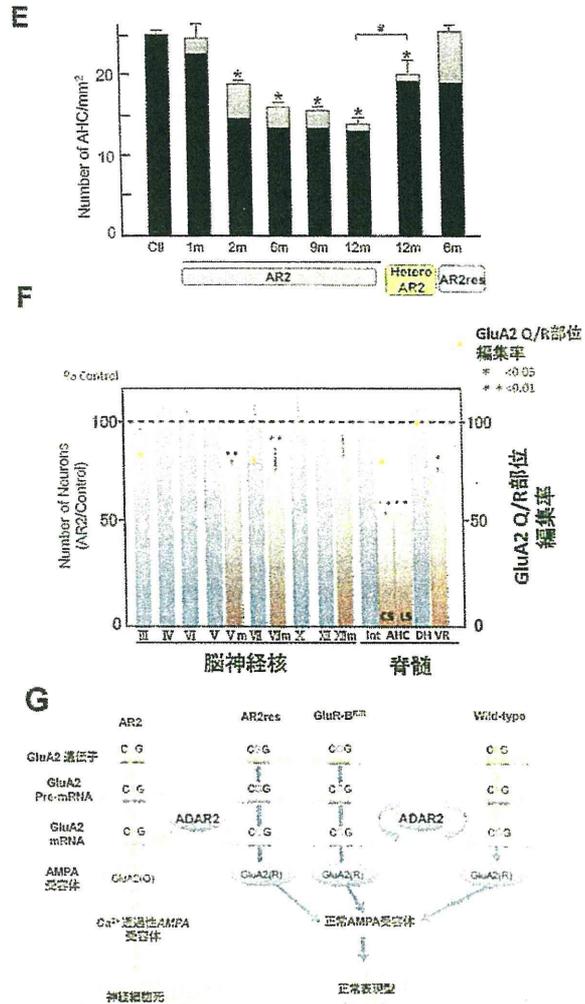
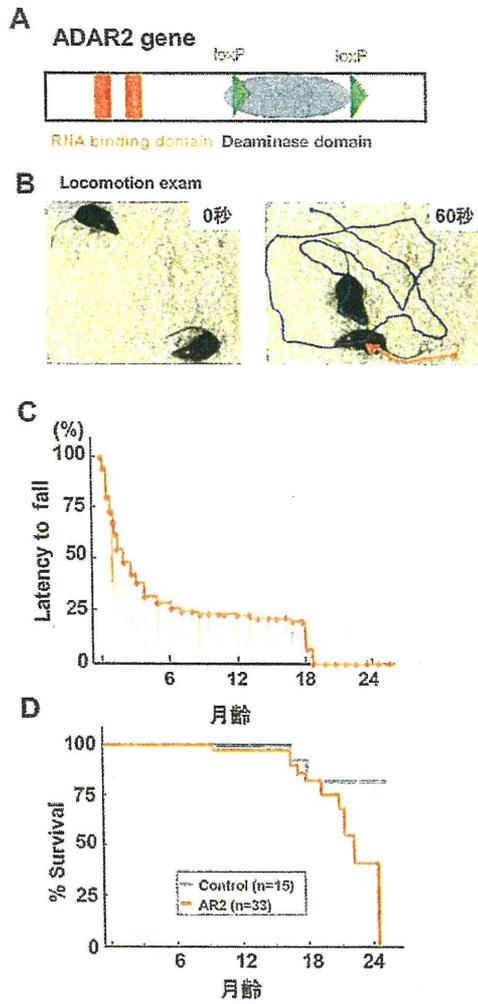
さらに、未編集型 GluA2 の発現が neurotoxic である根拠として、私たちは、AR 2 マウスと同時に作製した、HeteroAR2 (heterozygous ADAR2^{flx/+}/VChT-Cre) マウスにおいてわずかな未編集型 GluA2 の発現による神経細胞死が生じていたこと (図 1E)¹⁸⁾, AR2res による編集型 GluA2 の導入による細胞死抑制が (図 1E, G), それを支持する. とくに、Hetero AR2 マウスの検討からは、未編集型 GluA2 の発現が多寡を問わず neurotoxic であり¹⁸⁾, AR2 マウスおよび Hetero AR2 マウスの検討¹⁸⁾, 孤発性 ALS 患者の運動ニューロンで GluA2 Q/R 部位が 0% のニューロンが検出されたことなどから¹⁷⁾, 仮説のように運動ニューロンにおいて未編集型 GluA2 を発現する運動ニューロンが何時死ぬのかは、かなり確率的な現象であり、未編集型のみを発現していても 1 年以上生存するものもあるがあることもその考えを支持する (図 2F).

IV. 今後の展望

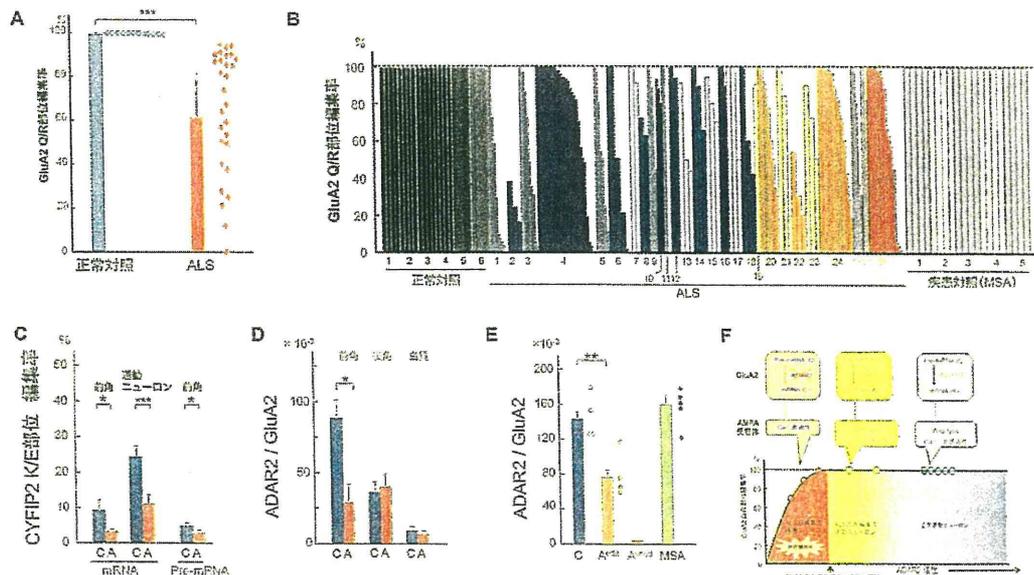
以上から、編集型 GluA2 のみを発現している ALS 運動ニューロンでも ADAR2 活性が低下していたことは、孤発性 ALS では ADAR2 mRNA 発現レベルが進行性に低下していること、その低下が GluA2 の全てを編集型に維持するために必要なレベル以下にまで達すると未編集型 GluA2 を発現し、細胞死のカスケードに順次組み入れられることが想定される. すなわち、ALS 運動ニューロンは ADAR2 活性が低下していても、その活性が全ての GluA2 Q/R 部位の RNA 編集に必要な閾値に達するまでは、ほぼ正常な機能を保つことが出来るが、この閾値を超えて低下した時点で発症することを示唆している. このように孤発性 ALS の病因として ADAR2 活性低下が前臨床段階から生じていることが明らかになった. このことにより、孤発性 ALS の病因が機能分子の活性低下による可能性が高くなり、発症前診断、病因解明、特異的治療開発の展望が開けた. 今後、さらに研究をすすめ、孤発性 ALS の病因、治療が開発できるように日々努力して行きたい。

参考文献

- 1) Higuchi M, 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.
- 2) Brusa R, et al : Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science* **270** : 1677-1680, 1995.
- 3) Hideyama T, et al : Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci* **30** : 11917-11925, 2010.
- 4) Aizawa H, et al : TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol* **120** : 75-84, 2010.
- 5) Kawahara Y, et al : what is unique about the AMPA receptors expressed on spinal motor neurons? *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **6** : 131-144, 2005.
- 6) Peng PL, et al : ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron* **49** : 719-733, 2006.
- 7) Misawa H, et al : VChT-Cre.Fast and VChT-Cre.Slow: postnatal expression of Cre recombinase in somatomotor neurons with different onset. *Genesis* **37** : 44-50, 2003.
- 8) Kuner R, et al : Late-onset motoneuron disease caused by a functionally modified AMPA receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** : 5826-5831, 2005.
- 9) Kwak S, Kawahara Y : Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med* **83** : 110-120, 2005.
- 10) Takuma H, 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* **46** : 806-815, 1999.
- 11) Kawahara Y, 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* **18** : 23-33, 2003.
- 12) Kawahara Y, et al : Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* **427** : 801, 2004.
- 13) Suzuki T, et al : Recent advances in the study of AMPA receptors. *Folia Pharmacol Jpn* **22** : 515-526, 2003.
- 14) Kawahara Y, 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.
- 15) Chen CX, et al : 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.
- 16) Cenci C, et al : Down-regulation of RNA Editing in Pediatric Astrocytomas: ADAR2 EDITING ACTIVITY INHIBITS CELL MIGRATION AND PROLIFERATION. *J Biol Chem* **283** : 7251-7260, 2008.
- 17) Hideyama T, et al : Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons. *Neurobiol Dis.* Dec. 28, 2011.
- 18) Hideyama T, Kwak S : When does ALS start? ADAR2-GluA2 hypothesis for the etiology of sporadic ALS. *Front Mol Neurosci* **4** : 33, 2011.



ADAR2 コンディショナルノックアウトマウス (p.36)



孤発性 ALS と ADAR2 活性低下 (p.38)



When does ALS start? ADAR2–GluA2 hypothesis for the etiology of sporadic ALS

Takuto Hideyama^{1,2} and Shin Kwak^{1,2*}

¹ Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science Technology Agency, Kawaguchi-shi, Saitama, Japan

² Department of Neurology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

Edited by:

William Wisden, Imperial College, UK

Reviewed by:

Peter H. Seeburg, Max Planck Institute for Medical Research, Germany

William Wisden, Imperial College, UK

*Correspondence:

Shin Kwak, Department of Neurology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan.
e-mail: kwak-tky@umin.ac.jp

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common adult-onset motor neuron disease. More than 90% of ALS cases are sporadic, and the majority of sporadic ALS patients do not carry mutations in genes causative of familial ALS; therefore, investigation specifically targeting sporadic ALS is needed to discover the pathogenesis. The motor neurons of sporadic ALS patients express unedited GluA2 mRNA at the Q/R site in a disease-specific and motor neuron-selective manner. GluA2 is a subunit of the AMPA receptor, and it has a regulatory role in the Ca²⁺-permeability of the AMPA receptor after the genomic Q codon is replaced with the R codon in mRNA by adenosine–inosine conversion, which is mediated by adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2). Therefore, ADAR2 activity may not be sufficient to edit all GluA2 mRNA expressed in the motor neurons of ALS patients. To investigate whether deficient ADAR2 activity plays pathogenic roles in sporadic ALS, we generated genetically modified mice (AR2) in which the ADAR2 gene was conditionally knocked out in the motor neurons. AR2 mice showed an ALS-like phenotype with the death of ADAR2-lacking motor neurons. Notably, the motor neurons deficient in ADAR2 survived when they expressed only edited GluA2 in AR2/GluR-B^{R/R} (AR2res) mice, in which the endogenous GluA2 alleles were replaced by the GluR-B^R allele that encoded edited GluA2. In heterozygous AR2 mice with only one ADAR2 allele, approximately 20% of the spinal motor neurons expressed unedited GluA2 and underwent degeneration, indicating that half-normal ADAR2 activity is not sufficient to edit all GluA2 expressed in motor neurons. It is likely therefore that the expression of unedited GluA2 causes the death of motor neurons in sporadic ALS. We hypothesize that a progressive downregulation of ADAR2 activity plays a critical role in the pathogenesis of sporadic ALS and that the pathological process commences when motor neurons express unedited GluA2.

Keywords: ADAR2, RNA editing, GluA2, Q/R site, ALS, neuronal death, AMPA

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common adult-onset motor neuron disease. ALS is characterized by progressive paralysis with muscle wasting due to a selective loss of upper and lower motor neurons. More than 90% of ALS cases are sporadic, whereas the remaining ALS cases have more than one other affected family member (familial ALS) (Table 1). The majority of sporadic ALS cases do not carry mutations in the genes that are known to cause familial ALS, including Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*; Rosen et al., 1993; Jackson et al., 1997) *FUS/TLS* (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009) and *TARDBP* (TDP-43; Tabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Van Deerlin et al., 2008; Yokosaki et al., 2008). In contrast, TDP-43 pathology in the spinal cord motor neurons is considered to be a neuropathological hallmark of sporadic ALS and is observed in most sporadic ALS cases (Arai et al., 2006; Nomaama et al., 2006; Hasegawa et al., 2008) but not in the majority of familial ALS cases (Mackenzie et al., 2007; Lee et al., 2007; Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Van Deerlin et al., 2008; Yokosaki et al., 2008; Kurlanowski et al., 2009; Vance et al., 2009; Deng et al., 2010). These lines of evidence

suggest that there is a common pathogenic mechanism of sporadic ALS, which is not among the mutations in the genes that cause ALS phenotype in familial ALS that have been identified to date. Therefore, an investigation of the molecular abnormalities that occur specifically in the pathological tissues of patients with sporadic ALS is required to elucidate the disease pathogenesis. Because molecular abnormalities found in the patients' pathological tissues include both the cause and the consequence of pathological changes, it is necessary to demonstrate that the molecular changes of interest induce the ALS phenotype in animals.

We have demonstrated that the RNA editing of GluA2, a subunit of the L- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptor, at the glutamine/arginine (Q/R) site is inefficient in the motor neurons of sporadic ALS patients in a disease-specific and motor neuron-selective manner (Takuma et al., 1999; Kawahara et al., 2004). This is in marked contrast to the fact that all GluA2 mRNA was edited in the motor neurons of control subjects (Takuma et al., 1999; Kawahara et al., 2004), in patients with motor neuron diseases other than sporadic ALS (Kawahara et al., 2006), and in dying neurons in other neurodegenerative diseases,

Table 1 | Uniform sporadic ALS and multiple different familial ALS.

Incidence	Sporadic ALS		Familial ALS			
	~ 90%		~ 10%			
		ALS1	ALS6	ALS10	Other fALS with known gene mutations	Other fALS with unknown mutations
		20–40%	4–5%	5–10%	~10%	30~60%
Age at onset	64.6 ± 11.5	Average; 43–46 y.o.	Average; 44–45 y.o.	Range 30–75 y.o., average 55 y.o.	Juvenile; ALS2, ALS4, adult; ALS8, ALS9, OPTN	Juvenile; ALS5, adult; ALS3, 7
Causative genes	Unknown	Cu/Zn superoxide dismutase (<i>SOD1</i>)	Fused in sarcoma/translated in liposarcoma(<i>FUS/TLS</i>)	TAR DNA-binding protein (TDP)-43 (<i>TARDBP</i>)	ALS2; alsin, ALS4; senataxin, ALS8; VAPB, ALS9; ANG	ALS3; 18q21, ALS5; 15q15.1-q21.1, ALS7; 20ptel
Inheritance	Sporadic*	AD	AD/AR	AD	ALS2; AR, ALS4; AD, ALS8; AD, dynactin; PGRN; ANG; AD, OPTN; AD/AR	Variable
Clinical feature	Classic, PBP > dementia	Multisystem degeneration LMN dominant LMN > UMN, PBP, dementia	Classic, LMN dominant LMN > UMN > PBP > dementia	Classic, PBP > dementia	Variable OPTN: Classic	Variable
Pathology	UMN + LMN degeneration	Degeneration of Clarke's neurons, posterior horn, and spinocerebellar tract	LMN and spinal cord dominant degeneration	UMN + LMN degeneration	Variable	Variable
Bunina body	+	–	–	+	Unknown, OPTN(–)	Unknown
TDP-43 pathology	+	–	–	+	Unknown, OPTN(+)	Unknown
Basophilic inclusion	–	–	+	–	Unknown, OPTN(–)	Unknown
RNA editing	Under-edited	Normal	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
Model animal	AR2 mouse	SOD1 transgenic animal	FUS/TLS knockout/transgenic animal	TDP-43 knock-out/transgenic animal	ALS2 deficient mouse	Unknown

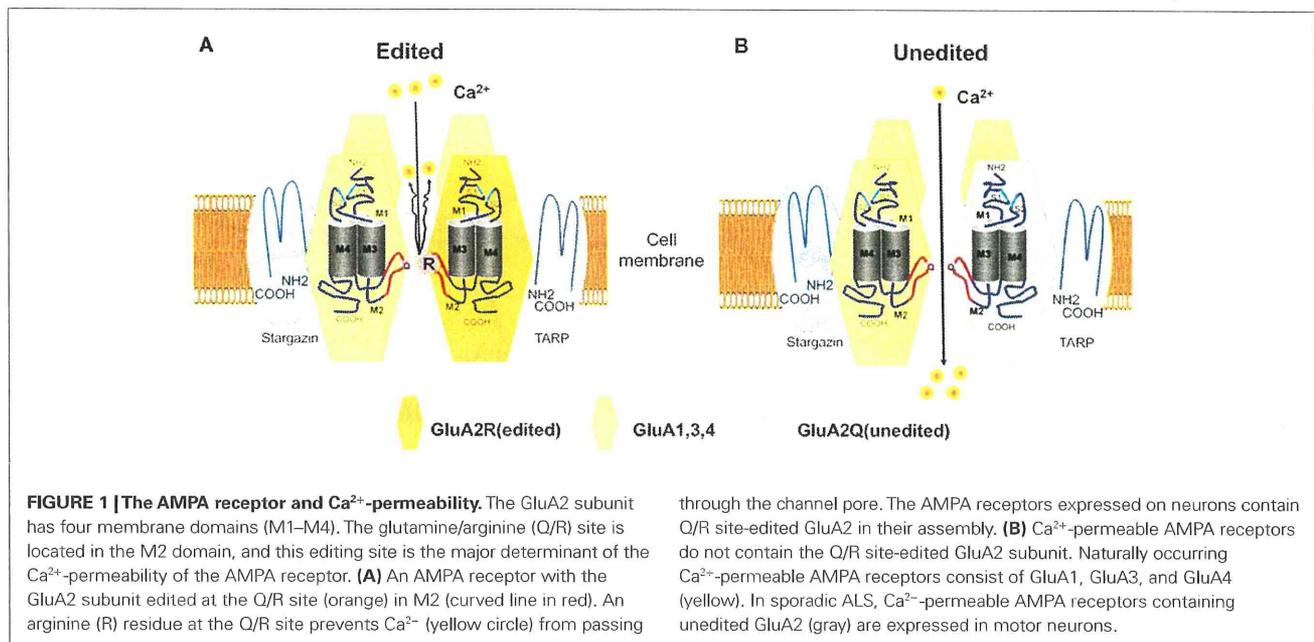
*A few% known gene mutations of FALS.

FALS, familial ALS; AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; UMN, upper motor neuron; LMN, lower motor neuron; VAPB, vesicle-associated membrane protein-associated protein B; OPTN, optineurin; classic, limb-onset classical ALS; PBP, progressive bulbar palsy; dementia, ALS with dementia; y.o., years old.

including the Purkinje cells of patients with spinocerebellar degeneration (Pacheco et al., 1994; Al-Bukhari et al., 1995; Suzuki et al., 2003; Kawabara et al., 2004). The high disease specificity warrants an investigation of how inefficient GluA2 RNA editing leads to neuronal death.

Functional AMPA receptors are tetramers with various combinations of GluA1, GluA2, GluA3, and GluA4 that are produced

in a non-stochastic fashion. All the GluA subunits are expressed in the human and rat spinal motor neurons (Lolk et al., 1993; Kawabara et al., 2003; Sun et al., 2005). In mammalian neurons, adenosine in the Q codon (CAG) is converted to inosine (A-to-I conversion) in the Q/R site of virtually all GluA2 mRNA (Figure 1A). This conversion results in the expression of the GluA2 protein with R in the Q/R site because the CIG codon



is read as the CGG codon (R) during translation. Because the A-to-I conversion at the Q/R site occurs only in the GluA2 subunit, and because the AMPA receptor subunit with R at the Q/R site critically regulates the Ca²⁺ permeability of AMPA receptors, AMPA receptors can be impermeable to Ca²⁺ only when they have Q/R site-edited GluA2 (Sommer et al., 1991; Notti and Lombot, 1994; Geiger et al., 1995). This evidence indicates that ALS motor neurons express abundant Ca²⁺-permeable AMPA receptors with Q/R site-unedited GluA2 (Kwak and Kawahara, 2005) (Figure 1B). Because trafficking of unedited GluA2 is more efficient (Geiger et al., 2002), a considerably high proportion of Ca²⁺-permeable functional AMPA receptors will be expressed in the ALS motor neurons even with small amounts of unedited GluA2 expression.

RNA editing at the GluA2 Q/R site is catalyzed by adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2), a member of the ADAR family (Figure 2; Higuchi et al., 2000). Therefore, investigating the following questions would help to reveal a neuronal death-causing mechanism in sporadic ALS: whether ADAR2-lacking motor neurons die, whether deficient ADAR2 is a direct cause of neuronal death, and whether failure of the A-to-I conversion at the GluA2 Q/R site plays a critical role in the death of ADAR2-lacking motor neurons. To address these aims, we developed mutant mice in which the ADAR2 gene is targeted selectively to motor neurons using the Cre-loxP system.

ADAR2 CONDITIONAL KNOCKOUT MICE (AR2)

It is not clear whether neuronal death occurs in neurons lacking GluA2 Q/R site editing or in those lacking ADAR2 because both systemic ADAR2-null mice (Higuchi et al., 2000) and genetically engineered mice that cannot edit the GluA2 Q/R site (Hirata et al., 1995) die young from status epilepticus. We crossed ADAR2^{fllox/fllox} mice with VAcHT-Cre.Fast mice that displayed restricted Cre expression under the control of the vesicular

acetylcholine transporter gene promoter in a subset of cholinergic neurons, including the spinal motor neurons (Mikawa et al., 2003). By intercrossing the resulting ADAR2^{+/fllox}/VAcHT-Cre.Fast mice, we obtained ADAR2^{fllox/fllox}/VAcHT-Cre.Fast (AR2) mice (Figure 3A; Hideyama et al., 2014). The AR2 mice displayed a slow, progressive motor dysfunction (Figures 3B,C) with a low rotarod performance (Figure 4A) and grip strength (Figure 4B). AR2 mice had slightly shorter life spans than the control mice (Figure 4C). We investigated the AR2 mice for morphological changes in the brain, spinal cord, motor nerves, and muscles, as well as for functional changes of the neuromuscular units at various postnatal periods. There were several degenerating large neurons in the anterior horn (AHCs) with cytoplasmic vacuoles (Figure 5A). To evaluate the progression of motor neuron death, we counted the number of motor neurons (SMI32-positive AHCs) with and without ADAR2 immunoreactivity. The number of SMI32-positive AHCs in AR2 mice markedly decreased between 1 and 2 months of age and slowly decreased beyond 1 year of age (Figure 5B). The motor neuron reduction is attributable to the loss of ADAR2-lacking AHCs. The number of ADAR2-positive AHCs remained unchanged after 2 months of age. There were darkly stained, degenerating axons with a decreased number of myelinated axons in the ventral roots (Figure 5C); these were the consequence of AHC degeneration. Skeletal muscles exhibited morphological characteristics of denervation, including muscle fiber atrophy, centrally placed nuclei, and pyknotic nuclear clumps. Electromyographic examination demonstrated fibrillation and fasciculation potentials, which are commonly observed in the denervated and reinnervated muscle fibers of ALS patients (Hideyama et al., 2014). Some neuromuscular junctions (NMJs) were abnormally innervated in AR2 mice; these NMJs were either lacking innervation (denervated NMJs), or they were innervated by ramified axons that innervated more than one NMJ (reinnervated NMJs; Figure 5D). The proportion of