

図3 AMPA受容体と神経細胞死

本文で述べたように、運動ニューロン疾患の神経細胞死には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。この結果は、変性疾患の細胞死のメカニズム、そして疾患分類を考える上で重要である。この異なる細胞死についてであるが、変異SOD1トランスジェニックマウスではAMPA受容体を介した神経細胞死が働いていることが、GluR2欠損マウスとの交配による興奮毒性の増強やCa²⁺を透過するQ/R部位を人工的なGluR2〔GluR-B (N), N (アスパラギン)〕を導入した変異マウスと変異SOD1遺伝子のdouble transgenicマウスにおける神経細胞死の促進から示されている。ALS1でGluR2のRNA編集が正常だとすると、GluR2の欠乏によるAMPA受容体のCa²⁺透過性亢進が予想されるが、GluR2の過剰発現により生存期間が延長することを示した報告、GluR3の発現量が増加しているとする報告は、この予測を支持する。特にGluR3の発現量増加は、私たちのグループのSunらがカイニン酸を長期髄注することにより作製したALSのモデルラットにもみられる分子変化であり、変異SOD1トランスジェニックマウス、家族性ALS1ではAMPA受容体の持続的的刺激により運動ニューロンの興奮性が高まった結果、相対的にGluR2の割合が下がることでAMPA受容体のCa²⁺透過性が亢進し、細胞死に至るカスケードにつながることを予想される。他方、アンドロゲン受容体のCAGリピートが伸長しているSBMAでは、同じポリグルタミン病であるハンチントン病モデルマウスでの検討からAMPA受容体を介した神経細胞死は働いていないと考えられる

知られているが、GluR2 Q/R部位のRNA編集がADAR2によって触媒されることは、ADAR2ノックアウトマウスではGluR2 Q/R部位編集が10%に低下すること⁹⁾、ADAR1ノックアウトマウスではこの部位の編集効率が100%に保たれること¹⁹⁾から示される。また、GluR2 Q/R部位に編集活性を持つのは*in vitro*でもADAR2だけである²⁰⁾。

ADAR2は二重鎖RNAに働く。GluR2 Q/R部位はエクソン11に位置するが、イントロン11内に、Q/R部位を含むエクソン11に相補的なexon complementary sequence (ECS)と呼ばれる配列がある。GluR2

pre-mRNAが二重鎖構造をとるためにはECS配列が必須であり、このECSを欠いた改変GluR2遺伝子を持つ遺伝子改変マウスは、GluR2 Q/R部位のRNA編集を欠く¹⁷⁾。また、AMPA受容体の4種のサブユニットでは、Q/R部位周辺の配列の相同性が高いにもかかわらずGluR2でのみQ/R部位のRNA編集が起こる理由は、イントロン11のECS配列がGluR2のみにみられることによる。

ADAR2のmRNA発現は、発達段階ごとに細胞ごとに調節されていることが知られている。ラットの検討で胎生19日に視床の細胞核にまず発現が観察されるこ

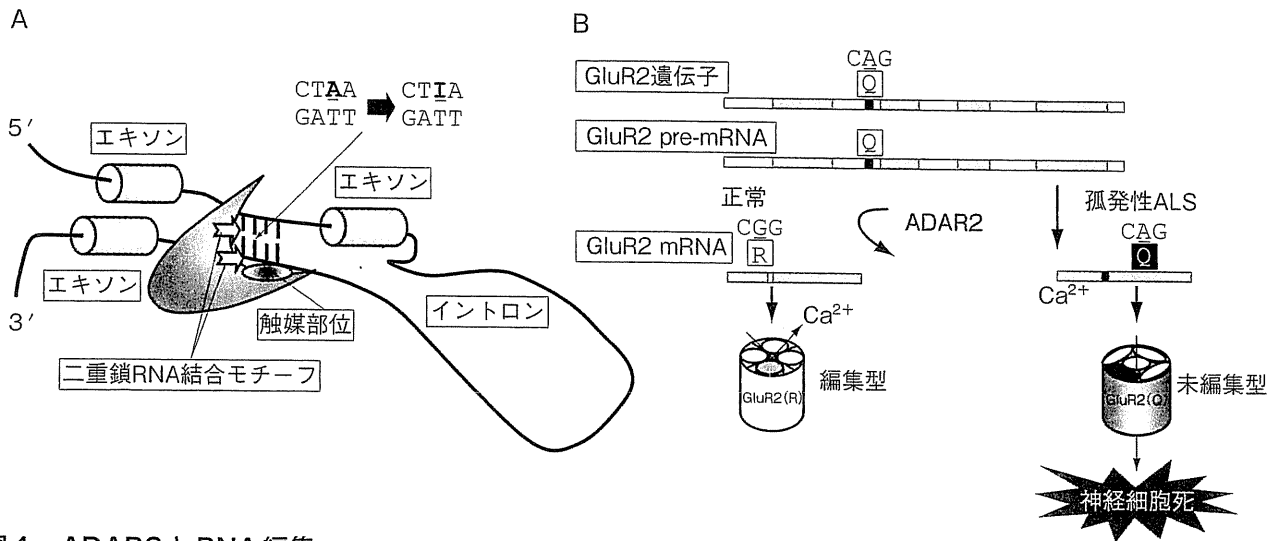


図4 ADAR2とRNA編集

A) GluR2 Q/R部位は、DNAからRNAへ転写後、mRNAになる前に、ADAR2によりアデノシン (A) からイノシン (I) へとRNA編集 (A→I編集) が起こることで塩基置換される。そして、リボソームでIはグアノシン (G) と同等であると見なされるため、CIGというコドンはCGGと見なされRとして翻訳される。B) ADAR2が働くとRNA編集が起こり、Ca²⁺を透過しないAMPA受容体ができるが、RNA編集が起こらないと孤発性ALSでみられるCa²⁺透過性のAMPA受容体になる

表 既知の哺乳類におけるA→I編集部位および神経・精神疾患

基質名	編集部位	編集により変化する性質	マウス全脳由来 mRNA 編集効率	担当酵素	疾患との関連	
AMPA型 グルタミン酸受容体	GluR2	Q/R部位	受容体チャネルのCa ²⁺ 透過性	100%	ADAR2	ALS(編集率低下) 悪性膠芽腫 (編集率低下*)
	GluR2, GluR3, GluR4	R/G部位	受容体チャネルの脱感作時間	GluR2: 75%, GluR3: 90%, GluR4: 45%	ADAR1, ADAR2	てんかんで GluR2 R/G部位 編集率上昇
	カイニン酸型 グルタミン酸受容体	GluR5	Q/R部位	受容体チャネルのCa ²⁺ 透過性	64%	ADAR1, ADAR2
GluR6		Q/R部位, I/V部位, Y/C部位	受容体チャネルのCa ²⁺ 透過性	Q/R部位: 86%, I/V部位: 87%, Y/C部位: 90%	ADAR1, ADAR2	側頭葉てんかん (GluR6 Q/R部位 編集率上昇)
セロトニン受容体	5-HT _{2c} R	A~E部位	Gタンパク結合効率	A部位: 75%, B部位: 80%, C部位: 15%, D部位: 70% E(C')部位	A, B部位: ADAR1 C, D部位: ADAR2	うつ病 (5-HT _{2c} 受容体 D, E部位編集効率 上昇)
GABA _A 受容体	Gabra3	I/M部位	受容体チャネルのCl ⁻ 透過性	90%	ADAR1, ADAR2	
膜電位依存型 カリウムチャネル	Kv1.1	S6ドメイン内	チャネルの不活化	48%	ADAR2	Episodic ataxia type I (編集異常は不明)**
RNA編集酵素	ADAR2	自己編集部位	酵素活性	15%	ADAR2	

*正常の白質組織と比較すると低下していない。 **本体は点突然変異であり、RNA編集異常の関与が考えられている。表をみるとわかるように、現在知られている編集部位は受容体やイオンチャネルに多くみられる。バイオインフォマティクスによる網羅的解析により、AI編集部位を全ゲノムで検索することが可能になり、非常に多くのRNA編集部位が発見された(約3000の異なった遺伝子以上に計3万カ所あまり)。その多くが非翻訳領域であるAlu配列やLINEのようなレトロトランスポゾン由来の反復配列に存在する。非翻訳領域の反復配列からなる二重鎖RNA構造はRNA編集により安定性が減少すると考えられ、進化による誘導やmRNAの安定性や翻訳効率への影響、スプライシング効率の調整、RNAiへの関与などが推測されている

とが*in situ* hybridization法によって確認された。その後発現分布は生後3週目まで増加し、より広範になっていくが最も発現が強いのが視床であり、一方で白質の発現は非常に少ないことが示されている²¹⁾。ヒト脳における検討でも、灰白質に豊富に発現しており、白質では少ない¹⁰⁾。RNA編集部位は多数知られており、特に中枢神経系に発現するmRNAに多い。編集部位の多くは非翻訳領域に位置し、GluR2 Q/R部位のような翻訳領域のものは1%以下である。その中で、特異的にADAR1ないしADAR2が触媒されていることが明らかにされている部位は必ずしも多くない²²⁾。ADAR1のノックアウトマウスが胎生致死であることから¹⁹⁾、ADAR1の触媒するRNA編集部位は発生の段階で生存に不可欠な役割を持つことが示されている。ADAR2のノックアウトマウスは出生するものの、生後20日以内に痙攣重積によって死に至るが、ゲノムレベルでGluR2 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すると表現型は正常化することから⁹⁾、GluR2Q/R部位以外のRNA編集は個体の生存にとり必ずしも不可欠なものではない。

3) ADAR2 活性と孤発性ALS

GluR2 mRNAは、ヒト中枢神経系において、部位や細胞を問わず、AMPA受容体サブユニットmRNAの中で最も多く発現している。AMPA受容体のCa²⁺透過性は、GluR2サブユニットを含んでいるか、そのGluR2サブユニットのQ/R部位が編集されているかどうかによって決まるが、ラット脳では胎生14日以降はGluR2 Q/R部位は完全に編集されており、成長に伴って編集されたGluR2サブユニットの発現量が増えることによって、Ca²⁺透過性が低くなっていくと考えられる。GluR2サブユニットは、動物脳において成長時期や部位にかかわらず完全に編集され、正常の脊髄前角ニューロンにおいてもすべて編集されている。ADAR2コンディショナルノックアウトマウスの検討でも、ADAR2活性の低下により未編集型のGluR2サブユニットが増えることは、神経細胞死の直接原因であることが明らかになっている²³⁾。このように、GluR2 Q/R部位のRNA編集は直接生命維持に関わることからADAR2による編集が厳密に行われていることが示唆される。ヒト正常脳での検討では、ADAR2は灰白質に豊富に発現しており、GluR2 Q/R部位のRNA編集

率は100%であるが、白質での発現量は少なく、GluR2 Q/R部位のRNA編集率は必ずしも100%ではない²⁴⁾。したがって、ADAR2 mRNA発現レベルはGluR2 Q/R部位における編集活性を反映するが、孤発性ALSの脊髄ではADAR2 mRNAの発現レベルが低下しており⁷⁾、ADAR2活性低下がGluR2 Q/R部位のRNA編集異常を引き起こしていると考えられる。

このように、孤発性ALSではADAR2活性低下がGluR2 Q/R部位のRNA編集異常を通じて運動ニューロン死を引き起こしている可能性が高いことから、ADAR2活性の正常化が特異的治療につながると考えられる。今後、ADAR2の活性回復を治療方法として検討するためには、スクリーニングとしてADAR2活性測定系が必要である。*in vitro*スクリーニングシステムとしては、ADAR2活性をRNA編集率に反映させる培養細胞系が有用であるが、既存の培養細胞系はGluR2 mRNAの発現量が低かったり、Q/R部位のRNA編集率が100%であるため、ADAR2活性のスクリーニングには適していない。そのため、Q/R部位を含むヒトGluR2遺伝子の一部をHeLa細胞に組み込み、このGluR2遺伝子のQ/R部位の編集率が定常的に50%前後である細胞株(TetHeLaG2m細胞)を作製した²⁵⁾。さらにその系を用いて40種類以上の薬物の検討から、複数の薬物にADAR2活性賦活作用があることが明らかになり、その分子メカニズムが、ADAR2 mRNA対GluR2ミニ遺伝子転写物比(酵素対基質量比)依存的事であることを報告した²⁵⁾。治療薬としての有用性は動物に投与しての*in vivo*での効果を検討する必要があるが、前述のようにGluR2 Q/R部位のRNA編集率は100%に保たれているため、ADAR2活性の賦活効果を検討するには不適當である。われわれは、ADAR2活性を*in vivo*で測定するための基質の検索を行い、中枢神経系に豊富に発現するCYFIP2(cytoplasmic fragile X mental retardation protein interacting protein) mRNAのK/E部位がADAR2の特異的基質であることを明らかにし、ADAR2活性を*in vivo*で測定するツールを開発した²²⁾²⁶⁾。今後これらの実験系を用いADAR2活性賦活作用があった薬剤について*in vivo*での効果を確認し、孤発性ALS治療法の開発につなげたい。

この研究は、文部科学省科学研究費、厚生労働省科学研究費によって行った。

文献

- 1) Kawahara, Y. et al. : Nature, 427 : 801, 2004
- 2) Sun, H. et al. : J. Neurochem., 98 : 782-791, 2006
- 3) Rothstein, J. D. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 6591-6595, 1993
- 4) Couratier, P. et al. : Lancet, 341 : 265-268, 1993
- 5) Brorson, J. R. et al. : J. Neurosci., 14 : 187-197, 1994
- 6) Iihara, K. et al. : J. Neurosci., 21 : 2224-2239, 2001
- 7) Kawahara, Y. & Kwak, S. : Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord., 6 : 131-144, 2005
- 8) Kwak, S. & Kawahara, Y. : J. Mol. Med., 83 : 110-120, 2005
- 9) Higuchi, M. et al. : Nature, 406 : 78-81, 2000
- 10) Kawahara, Y. et al. : J. Neurochem., 85 : 680-689, 2003
- 11) Takuma, H. et al. : Ann. Neurol., 46 : 806-815, 1999
- 12) Paschen, W. et al. : J. Neurochem., 63 : 1596-1602, 1994
- 13) Akbarian, S. et al. : Brain Res., 699 : 297-304, 1995
- 14) Suzuki, T. et al. : Folia Pharmacol. Jpn., 122 : 515-526, 2003
- 15) Kawahara, Y. et al. : Neurosci. Res., 54 : 11-14, 2006
- 16) Kwak, S. & Weiss, J. H. : Curr. Opin. Neurobiol., 16 : 281-287, 2006
- 17) Brusa, R. et al. : Science, 270 : 1677-1680, 1995
- 18) Levanon, E. Y. et al. : Nature Biotechnol., 22 : 1001-1005, 2004
- 19) Wang, Q. et al. : Science, 290 : 1765-1768, 2000
- 20) Rueter, S. M. et al. : Nature, 399 : 75-80, 1999
- 21) Paupard, M. C. et al. : Neuroscience, 95 : 869-879, 2000
- 22) Nishimoto, Y. et al. : Neurosci. Res., 61 : 201-206, 2008
- 23) Hideyama, T. et al. : Abstr. Neurosci. 2008, 745 : 17, 2008
- 24) Kawahara, Y. et al. : Eur. J. Neurosci., 18 : 23-33, 2003
- 25) Sawada, J. et al. : Neurosci. Res., 64 : 251-258, 2009
- 26) Kwak, S. et al. : RNA Biol., 5 : 193-197, 2008

<筆頭著者プロフィール>

日出山拓人：国立国際医療センター，日本赤十字社医療センター，虎の門病院を経て総合内科専門医，神経内科専門医を取得後，東京大学大学院医学系研究科を修了．東京大学医学部附属病院勤務を経て，現在，東京大学保健・健康推進本部に勤務し，本郷・駒場・柏キャンパスで職員・学生の健康を守っています．大学院入学後から現在も，郭伸准教授のもとで孤発性ALSの治療を見つけるため，研究を続けております．

孤発性ALS患者運動ニューロンに見出された分子病態RNA editing異常に基づいたモデルマウスの開発

Development of a mouse model of sporadic ALS by targeting RNA editing, the disease-specific molecular abnormalities demonstrated in patients' motor neurons



日出山拓人(写真) 郭 伸

Takuto HIDEYAMA^{1,2} and Shin KWAK²

東京大学保健・健康推進本部、同大学院医学系研究科神経内科

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は9割以上が孤発性である。著者らは、孤発性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GluR2の本来RNA編集されるべきQ/R部位の未編集のものが発現している分子異常が疾患特異的に生じていることを、患者剖検脊髄の解析から明らかにした。このGluR2 Q/R部位のRNA編集は、adenosine deaminase acting on RNA type 2(ADAR2)により特異的に触媒される。そのため著者らは、孤発性ALSはADAR2活性低下によるGluR2 Q/R部位のRNA編集低下が神経細胞死を引き起こす、という仮説を立て、あらたに開発したADAR2コンディショナルノックアウトマウスの解析から検証した。このことは、GluR2のRNA編集異常が孤発性ALSの病因と密接に関連する分子異常であることを示している。

Key word : 筋萎縮性側索硬化症(ALS)、AMPA受容体、GluR2(GluR-B、GluA2)、RNA編集、ADAR2、ノックアウトマウス

AMPA受容体を介した神経細胞死

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Ca²⁺流入に引き続いて起こる。また、AMPA受容体はGluR1-4(GluA1-4)の4種のサブユニットからなる四量体で、Ca²⁺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Ca²⁺非透過性で、1個も含まないものはCa²⁺透過性である。ただし、GluR2は転写後にQ/R部位のRNA編集を受けてはじめてCa²⁺非透過性を獲得するので、未編集型GluR2を含むAMPA受容体もCa²⁺透過性である。

著者らのグループは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¹⁾および脊髄前角組織レベル²⁾の検討において、部位選択的・疾患特異的にGluR2 Q-

R(グルタミン・アルギニン)部位の編集率が低下していること、しかしGluR2 mRNA発現量には有意な変化がないこと³⁾を確認した。この分子変化の疾患特異性、部位選択性を検討した結果、孤発性ALSで変性しない小脳Purkinje細胞のほか、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Purkinje細胞¹⁾、Huntington病の線条体、Alzheimer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⁴⁾。さらに、運動ニューロンに変性を生じるトリフレットリヒ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でもっとも頻度が高いSOD1関連性家族性ALS(ALS1)の運動ニューロンでも、GluR2 Q/R部位のRNA編集には変化がないことを明らかにし⁵⁾、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

を除外した。

ADAR2とGluR2 Q/R部位

GluR2 Q/R部位のRNA編集は、mRNAのアデノシン・イノシン置換(A-to-I conversion)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。A-to-I置換はadenosine deaminase acting on RNA(ADAR)により触媒される。ADARは3種(ADAR1, 2, 3)が知られているが、GluR2 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⁹⁾。孤発性ALS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¹⁰⁾、ADAR2活性を規定する因子のひとつであるADAR2 mRNA発現量の減少が認められている¹¹⁾。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、GluR2 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¹²⁾。また、全身的ADAR2ノックアウトマウスは脳のGluR2 Q/R部位のRNA編集率が著減し、痙攣重積で死亡するが、GluR2遺伝子を編集型GluR2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⁹⁾。

以上より、孤発性ALSはADAR2活性低下によりGluR2 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、という仮説を立てた。

コンディショナルノックアウトマウスの作製

上述したHiguchiらの全身的ADAR2ノックアウトマウスは、編集型GluR2 pre-mRNAが10%に低下し、生後20日以内に痙攣重積で死に至る⁹⁾が、この時間経過・表現型はALSとは異なり、神経の過剰興奮に伴う痙攣に伴う死と考えられ、ADAR2活性低下が直接に神経細胞死を引き起こすかどうかは明らかではなかった。そこで非特異的痙攣死を避けるために、運動ニューロン特異的にADAR2をノックアウトすることによりニュー

サイド
メモ

RNA編集 (RNA editing)

一般に、pre-mRNAは遺伝子から転写された後、スプライシングを受けイントロン部分が切りたされてmRNAが形成される。遺伝情報は正確に転写されなければ生死にかかわるような重大な障害をきたす可能性があるが、遺伝子からmRNAが形成される過程で、遺伝情報が書き換えられることがある。これをRNA編集(RNA editing)とよび、蛋白質の一次構造はすべてDNAが決定すると信じられており、DNA情報を転写し、蛋白質を合成につくることがRNAの重要な役割と考えられてきた。しかし、このセントラルドグマに反するかのような、後にRNA編集と命名される現象がTrypanosoma(原虫毛虫類)のkinetoplastid(ミトコンドリアに相当)DNAの転写過程で発見された。

RNA編集を受ける部位がエクソンに位置し、転写後のコドン置換を伴う場合には蛋白質の機能を要する場がある。生物学的にも重要な例として、アデノシン・イノシン(A→I)置換は中枢神経系でもっとも活発に生じており、孤発性ALSで異常が認められるAMPA受容体サブユニットGluR2(GluA2) Q/R部位のRNA編集も、A→I置換によりCAG(グルタミンのコードン)がCIG(CG G: ア

ルニリンRコドン)に置換することでアミノ酸置換が起こる。アミノ酸置換を伴うA→I置換はGluR2 Q/R部位以外にも、カイニン酸受容体サブユニットであるGluR5(GluK1)、GluR6(GluK2)のQ/R部位やAMPA受容体のGluR2(GluA2)、GluR3(GluA3)、GluR4(GluA4)サブユニットのR/G部位、电压依存性KチャネルKv1.1のIV部位、5HT₂受容体のA→E部位に起こり、RNA編集の有無によりチャネル特性に変化をもたらす。また、ADAR2のself-editingではスプライシングサイトの多化によるフレームシフトにより酵素活性が変化するなど、さまざまなRNAの、それも複数の部位で生じている。なかでも、GluR2のQ/R部位は胎生期から成熟期に至るまではほぼ100%編集されている点、この部位のRNA編集が不十分で未編集型GluR2を発現することが運動ニューロン死を引き起こすという点で特異的である。ADAR1ノックアウトマウスが胎生致死であることから、他のRNA編集部位(大多数はnon-coding部位に存在する)にも細胞の生死にかかわる部位が存在することは想定されているが、特定されていない。

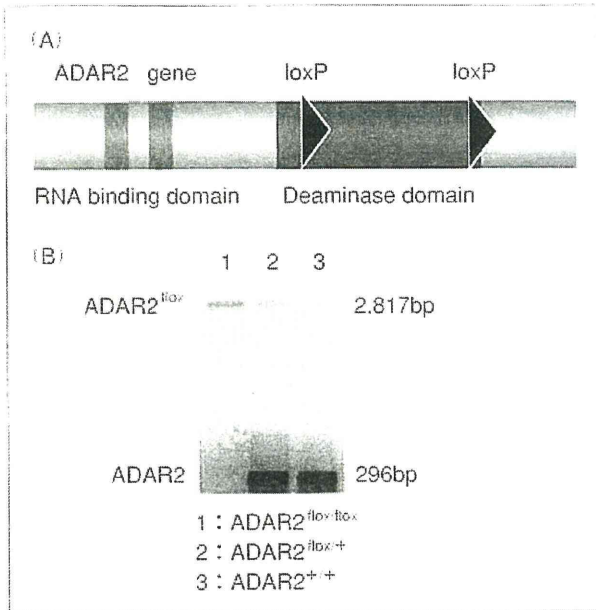


図1 ADAR2コンディショナルノックアウトマウスの作製

ADAR2 は、2 個の二本鎖 RNA 結合部位(RNA binding domain)と、1 カ所の編集触媒部位(deaminase domain)からなる。ADAR2 遺伝子の deaminase domain をコードするエクソンを LoxP(▶)で挟んだ変異マウス(ADAR2^{fllox/fllox})を作成し、VACHT-Cre. Fast マウスとの交配によって、Cre-LoxP 系により ADAR2 をノックアウトする ADAR2^{fllox/fllox} VACHT-Cre. Fast (AR2 マウス)を作製した。

ロン死が生じるかどうかを検討した。この目的のため、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})を作成し(図 1-A, B)、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ーにより 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(VACHT-Cre. Fast)¹⁰との交配により、ADAR2^{fllox/fllox} VACHT-Cre. Fast(以下、AR2 マウス)を Cre-LoxP 系を用いて作製した¹¹⁾。

脊髄前角の大径運動ニューロンの一部で正常な ADAR2 mRNA が発現していないことを PCR 法および ISH 法で確認し、これらのニューロンでは ADAR2 蛋白が発現していないことを免疫組織化学で確認した。さらに、ADAR2 が発現していないニューロンでは Cre が発現していることを PCR 法で確認し、これらのニューロンでは GluR2 Q R 部位の編集率が低下していることを確認し、Cre LoxP 系によるノックアウトが働いているこ

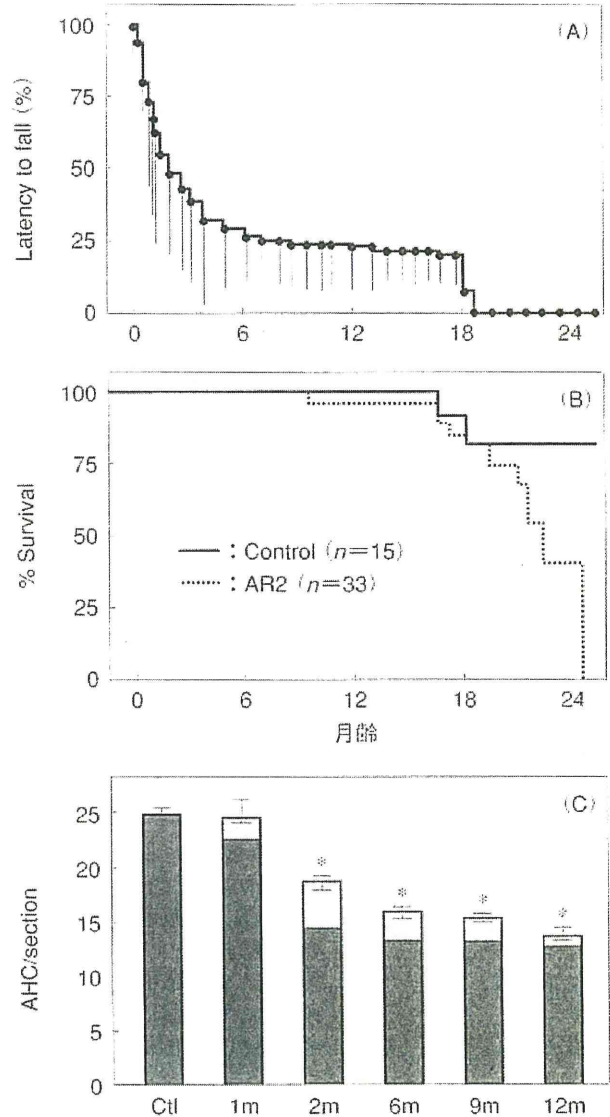


図2 AR2のロータロッド、生存期間、細胞死の経過

- A: 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、10 rpm で 180 秒を最大値とし、3 回施行した最大値と比較した。●のフ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。
- B: 生存期間は正常対照が 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)。
- C: 脊髄前角大径運動ニューロンの特異的のマーカーである SMI32 と ADAR2 の二重免疫染色を行い、正常対照 1, 2, 6, 9, 12 カ月齢(1, 2, 6, 9, 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(濃いグレーのカラム)、SMI32 陽性、ADAR2 陰性の運動ニューロン数(薄いグレーのカラム)をカウントした。正常対照ではすべ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 カ月齢から 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.

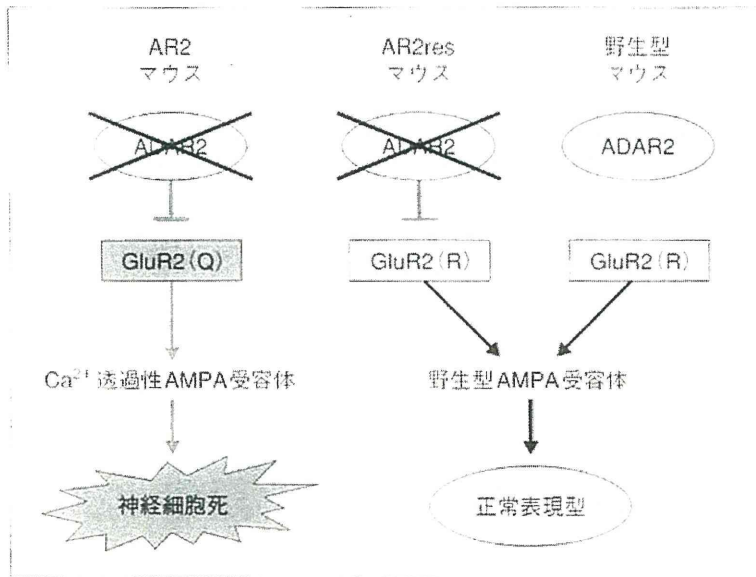


図3 GluR2 Q/R部位は運動ニューロンの生存に必須である

野生型マウスではADAR2によりGluR2 Q/R部位のRNA編集が正常に行われ、編集型のGluR2(R)が発現し、野生型のCa²⁺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GluR2 Q/R部位のRNA編集が行われず、未編集型のGluR2(Q)が発現し、Ca²⁺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きたす。AR2resはGluR2^{fl/fl}マウスと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GluR2(R)を発現するようにした変異マウスである(本文参照)。AR2resマウスではADAR2活性はないが、編集型GluR2(R)が発現し、Ca²⁺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GluR2 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GluR2の発現によるAMPA受容体のCa²⁺透過性亢進により生じたと考えられた。

とを確認した。

AR2マウスは5週齢以降6カ月齢にかけて緩徐進行性に運動機能の低下(ロータロッド: 図2-A)が認められ、有意な生存期間の短縮がみられた(図2-B)。さらに、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の発現時間および発現頻度に一致して緩徐進行性に認められた。運動ニューロンの脱落はADAR2を欠損した運動ニューロンにのみ生じており、ADAR2陽性運動ニューロン数にはCreの発現がプラトーに達する2カ月齢以降有意な変化がなかった(図2-C)。ADAR2陰性運動ニューロンの脱落は1~2カ月齢の間でもっとも顕著であり、その後緩徐に進行し、12カ月齢でもADAR2を欠損した運動ニューロンが少数残存していた。電気生理学的にも脱神経を

示すfasciculationおよびfibrillationが被検筋で認められ、形態的には筋線維の小角化線維が認められた。神経筋接合部(NMJ)の検討では除神経NMJ、複数の神経による再支配像が認められ、細胞の脱落が活発に認められる4カ月齢に比べ、14カ月齢では後者の像が多く認められた。

クリアの検討では、神経細胞の脱落が活発な時期に一致してMac2陽性のreactive microgliaが著増し、GFAP陽性のreactive astrocyteは神経脱落に平行した増加が認められた。また、運動性脳神経核ではいずれにおいてもGluR2 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かかわらず、神経細胞死は認めなかった¹¹⁾。

さらに、この神経細胞死が未編集型 GluR2 のみによるかどうかを検討するために、ゲノムレベルで GluR2 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¹²⁾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 GluR2 を発現する変異マウス(AR2res)を作成した(図 3)。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。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 GluR2 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、GluR2 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¹¹⁾。この結果は、孤発性 ALS では ADAR2 活性低下による GluR2 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を支持する。動眼神経核運動ニューロンが GluR2 Q R 部位の編集率低下にもかかわらず細胞死を免れていたことは、カルシウム結合蛋白である parvalbumin 含有量が脊髄運動ニューロンに比べ多いためカルシウム毒性への抵抗性が高いことによると考えられる。

おわりに

著者らは患者組織の解析から GluR2 Q R 部位の編集率低下という疾患特異的な分子変化を見出し、これが運動ニューロン死の直接原因となることをモデルマウスの開発・解析により明らかにした。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、特異的治療開発の展望が開けたといえる。今後、このマウスのさらなる解析により、孤発性 ALS の病因、治療が開発できるように日々努力していきたい。

文献

- 1) Kawahara, Y. et al. : Glutamate receptors : RNA editing and death of motor neurons. *Nature*, **427** : 801, 2004.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Suzuki, T. et al. : Recent advances in the study of AMPA receptors. *Folia Pharmacol. Jpn.*, **122** : 515-526, 2003.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Kwak, S. and Kawahara, Y. : Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Mol. Med.*, **83** : 110-120, 2005.
- 9) Peng, P. L. et al. : ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron*, **49** : 719-733, 2006.
- 10) Misawa, H. et al. : VACHT-Cre. Fast and VACHT-Cre. Slow : postnatal expression of Cre recombinase in somatomotor neurons with different onset. *Genesis*, **37** : 44-50, 2003.
- 11) Hideyama, T. et al. : Development of a mouse model of sporadic ALS by deficient RNA editing. *J. Neurosci.*, **30** : 11917-11925, 2010.
- 12) 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.

* * *

<原 著>

小脳梗塞初期診断の問題点

齋藤 司¹⁾ 相澤 仁志¹⁾ 澤田 潤¹⁾ 油川 陽子²⁾ 片山 隆行¹⁾
 長谷部直幸¹⁾ 林 恵充²⁾ 安榮 良悟²⁾ 佐藤 正夫²⁾ 程塚 明²⁾

要旨:【背景・目的】小脳梗塞の臨床的特徴を検討し、初期診療上の問題点を明らかにする。
【方法】2006年1月1日から2008年12月31日までの3年間に、旭川医大病院 Stroke team が診療した脳卒中患者514例のうちの小脳梗塞患者22例(4.3%)を対象とした。**【結果】**典型的な小脳症状を全く呈さない症例、あるいは一つのみ呈する症例が8例(36.4%)見られた。3例が救急車を利用し発症後3時間以内に受診したにもかかわらず、当初小脳梗塞と診断されず神経内科や脳神経外科以外の病棟に入院した。その3例はいずれもめまいを主訴とし、構音障害と歩行障害が見られなかった。その他2例を合わせ全体の22.7%にあたる5例が、Stroke teamによる初期の診察を受けておらず、それが当初小脳梗塞と診断されなかった要因の一つと考えられた。**【結論】**めまいや嘔吐を主訴とする場合は、常に小脳梗塞である可能性を考慮する必要がある。Stroke teamによる早期の正確な神経学的診察が重要である。

Key words : cerebellar infarction, stroke team, stroke

(脳卒中 32 : 133-137, 2010)

はじめに

小脳梗塞は虚血性脳卒中の2~4%^{1)~5)}を占めるとされており、救急の現場ではしばしば遭遇する疾患である。典型的な症状と画像所見を呈する場合には診断は困難ではないが、めまいや嘔吐が前景に立ち、眼振や失調といった典型的な小脳症状を呈さない場合は誤診を招く可能性がある。また仮に眼振や小脳失調を呈していても、神経診察に習熟していない医師の場合、その異常所見を検出できない可能性もある。また画像診断においても限界があり、その性質を充分理解した上で利用しなければならない。以上のように小脳梗塞患者の診療に関しては、注意すべき点が多い。これまでに、小脳梗塞患者の初期診断の問題点について複数症例で検討した報告は少ない。本研究では小脳梗塞の臨床的特徴を検討し、診療上の問題点を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

2006年1月1日から2008年12月31日までの3年間に、旭川医大病院 Stroke team が診療した脳卒中患者514例のうち、画像上小脳のみで病巣を持ちテント上や脳幹に病巣を持たない小脳梗塞患者22例(4.3%)を対象とし、後方視的に検討した。

結 果

症例の平均年齢は75歳で、分布は56歳から89歳までであった。男性が15例、女性が7例であった。来院方法は、救急車を利用して救急外来を受診した症例が72.7%、自力で救急外来を受診した症例が4.5%、自力で通常の外来を受診した症例が22.7%であった。来院までに要した時間で分類すると、発症から3時間以内が27.3%、3時間から6時間以内が9.1%、6時間から24時間が40.9%、24時間以上が22.7%であった。左右で分類した梗塞巣の分布は、13例が右小脳半球のみ、5例が左小脳半球のみで、両側小脳半球は4例であった。小脳を支配する血管で分類した梗塞領域の分布は、上小脳動脈(SCA)が11例、後下小脳動脈(PICA)が14例であり、前下小脳動脈領

¹⁾旭川医科大学神経内科

²⁾同 脳神経外科

³⁾国立病院機構道北病院脳神経内科

(2009年10月9日受付、2009年11月21日受理)

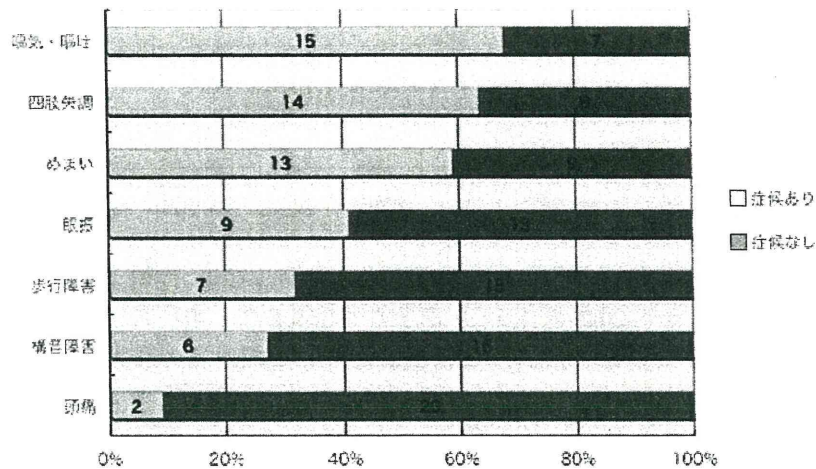


図1 代表的7症候の有無の割合
嘔気・嘔吐、四肢失調、めまいは半数以上が呈している。頭痛はわずかに2例と少ない。

域の梗塞はなかった。Stroke team 診察時に記載された症状・徴候から、嘔気・嘔吐、失調、めまい、眼振、歩行障害、構音障害、頭痛の7つを抽出し、これらがどの程度の割合で見られたかを図1に示す。嘔気・嘔吐とめまいなどの特異性に乏しい症状は大多数で見られたが、一方で失調という小脳症状として比較的特異性の高いと思われる症状もStroke teamの診察では14例(63.6%)と多くの症例に認められた。なお、めまいを呈した13例のうち、4例が明らかな回転性めまいを訴え、4例が浮動性めまいを訴え、残りの5例は性質がはっきりしない訴えのめまいであった。頭痛はわずかに2例のみに見られた。

次にこれら7つの症候のうち、特異性に乏しいと思われる嘔気・嘔吐とめまいを除いた5つについて、いくつ組み合わせて呈していたかを図2に示す。これによると、嘔気・嘔吐とめまい以外に、小脳梗塞を疑わせる症候を全く呈さない症例が22例中4例(18.2%)、1つしか症候を呈さない症例も4例存在しており、合わせて全体の約1/3にあたる8例(36.4%)が1つ以下の症状しか呈していなかった。

全体の22.7%にあたる5例が、Stroke teamによる初期の診察を受ける機会がなく、当初小脳梗塞と診断されていなかった。この5症例について、経過を簡潔に記載する。

症例1

77歳、男性。メニエール病の既往があった。某日

午前11時頃に回転性のめまいを自覚し救急車を利用して午前11時23分に当院救急外来を受診。拡散強調画像を含むMRIが撮影されるも急性期新鮮梗塞を疑わせる所見が認められず、他科に入院した。翌朝になり右上下肢の失調に気づかれ頭部MRIが再び撮影された。右SCA領域に新鮮梗塞を示唆する所見が認められ、ここではじめてStroke teamに診療を依頼。このとき自覚症状としては嘔気を訴え、神経学的には右向きの眼振と右上下肢の失調を呈していた。MRAでは右SCAの描出を認めなかった。左椎骨動脈には50%程度までの狭窄を認めたが、脳底動脈には異常を認めなかった。オザグレルナトリウムの点滴静注が行われたが、症状に明らかな改善を認めず、リハビリ目的に転院した。その後約2年間、失調に改善は見られていない。

症例2

77歳、女性。高血圧と心房細動のため当院循環器科通院中で、ワーファリンを内服中であった。某日午前0時30分に浮動性のめまいを自覚し、救急車にて午前1時56分に当院救急外来を受診。頭部CTが撮影され異常所見なく、他科に入院した。朝方に撮影されたMRIで右PICA領域に急性期脳梗塞所見が認められたため、Stroke teamに紹介あり。神経学的には右上下肢の失調と体幹失調を呈していた。MRAでは脳底動脈に異常所見を認めなかったが、右椎骨動脈が全く描出されていなかった。エダラボンとグリセオール

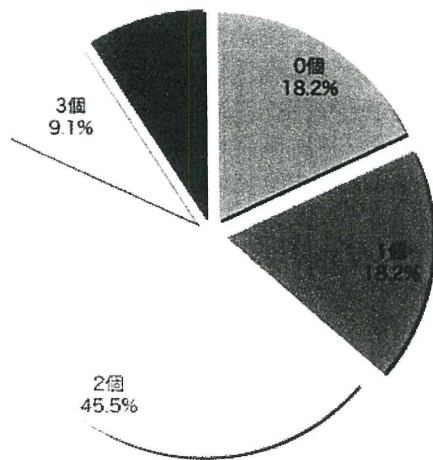


図2 代表的5症候をいくつ呈していたか
四肢失調、構音障害、歩行障害、眼振、頭痛の5症候をいくつ呈していたかをまとめた。0個と1個が各18.2%存在している。

の投与を行い、右上下肢の失調はあるかないかという程度まで改善したが、体幹失調が残存し歩行時のふらつきが見られたため、リハビリ目的に転院された。

症例3

81歳、女性。僧帽弁狭窄症と心不全、心房細動のため当院循環器科通院中で、ワーファリンを内服中であった。某日午後11時30分頃浮動性のめまいを自覚。翌日午前0時35分に救急車にて当院救急外来を受診。頭部CTが撮影され異常所見が認められないとのことで他科に入院した。翌日夜間に構音障害と意識障害が出現し急速に悪化したため撮影されたMRIで、右SCA領域に新鮮梗塞を示唆する所見が認められ、Stroke teamへ紹介となった。MRAでは脳底動脈に異常を認めなかったが、右SCA描出の途絶が見られた。また右椎骨動脈に50%以上の狭窄を認めた。自覚症状として嘔気を訴え、神経学的には右向き眼振、右上下肢の失調を呈していた。梗塞範囲に脳浮腫が著しく進行し梗塞後出血も合併していたため、即日開頭血腫除去術が施行された。意識障害は術後回復したが、右上下肢の失調が残存したため、リハビリ目的で他院へ転院された。

症例4

70歳、男性。既往に高血圧、高脂血症、耐糖能異常あり。某日午前9時30分農作業中にめまいを自覚し、

発症後30分で救急車にて当院救急外来を受診。めまいの性質は問診上ははっきりしなかった。髄膜炎を疑われ腰椎穿刺が実施されていた。当院受診5時間後にStroke teamに診察要請あり。このとき自覚症状として嘔気を訴え、神経学的には眼振、右上下肢の軽度の失調症状を呈していた。MRIで右PICA領域に新鮮梗塞を示唆する所見が認められた。MRAでは椎骨動脈、脳底動脈に異常所見を認めなかった。エダラボン、アルガトロバン、グリセオールの投与を行った。めまいと嘔気、失調症状はわずかに改善したが自宅退院は困難な状態と考えられ、リハビリ目的に転院された。

症例5

58歳、男性。高血圧、糖尿病、高脂血症と急性心筋梗塞の既往あり、アスピリンを内服していた。某日午後9時に回転性めまいを自覚し午後9時30分にかかりつけの近医を受診。頭部CT撮影されるも異常所見なく、経過観察目的で入院した。翌日症状が軽快したとの判断で自宅退院となった。しかしその後症状回復せず持続したため、5日後に自ら当科外来を受診。このとき回転性めまいと嘔気を訴えており、神経学的には左上下肢の失調と左への偏倚歩行を呈していた。MRIでは左PICA領域に梗塞所見を認めた。MRAでは椎骨動脈、脳底動脈に有意な狭窄や閉塞所見を認めなかった。めまいが改善せず持続したが自製内であり、2週間で自宅独歩退院した。

考 察

脳卒中は時間との戦いである。患者の予後は、診断・治療をいかに迅速にかつ正しく行うかにかかっている。小脳梗塞患者の初期診断における問題点を主に論じた報告は少ないが、最近の益田ら⁴⁾の報告によると、めまい・頭痛を主訴として受診した小脳梗塞患者33例中の実に58%にあたる19例が、当初脳梗塞と診断されていなかった。本報告では、残念ながら22例中5例(22.7%)に診断・治療の明らかな遅延が見られた。

他科に入院した症例1から3の3例は、いずれもめまいを主訴とし構音障害と歩行障害が見られなかった。救急車を利用し発症3時間以内に救急外来を受診したにもかかわらず、脳卒中である可能性が考慮されずStroke teamへの連絡が遅れた。神経内科や脳神経外科以外の病棟に入院した後に症状が増悪してから、小脳梗塞と診断された。この3例の画像診断については、症例1と症例2はCT撮影しかなされておらず、症例3は発症後30分で来院し、拡散強調画像を含む

MRI を撮影されていたが、急性期脳虚血の存在を示唆する所見は見られなかった。症例 4 は発症 30 分以内に救急外来を受診するも、救急外来では脳梗塞が疑われず、発症後 6 時間近く経過してから Stroke team へのコンサルトがあった。症例 5 も発症 30 分後にかかりつけの近医を受診するも、CT のみ撮影され、一泊入院のみで退院し 5 日後に当科外来を通常受診し、ようやく小脳梗塞の診断となった。

Savitz ら⁵⁾ は、当初正しく小脳梗塞と診断されなかった 15 症例を詳細に検討し、全例で神経診察とその記載が不十分であり、特に眼球運動、協調運動、歩行の診察についてその傾向が顕著であったことを報告している。そして神経診察を徹底すること、小脳梗塞で出現しうる症状を十分意識した上で診療に当たること、脳画像診断に関する正しい知識を持つことが小脳梗塞を診断する能力を向上させるであろうと結論している。特に神経診察については、めまいの最中の患者ではその苦痛のため失調症状や詳細な眼振の診察が困難なこともしばしばあるが、これらの評価は可能な限り行うべきである。

現在、脳血管障害の診断において画像診断は必須である。CT は普及率が高く、出血性病変の検出にすぐれ、撮影に要する時間が短いという利点があるが、骨によるアーチファクトのため、後頭蓋窩の急性期虚血性病変の評価には適さない⁶⁾。可能な限り MRI を撮影することが望ましいが、拡散強調画像の撮影が可能でも、超急性期には新鮮梗塞を示唆する所見が出現しない場合がある点に留意すべきである。Oppenheim ら⁷⁾ の報告では、椎骨脳底動脈領域の虚血性脳卒中患者のなかで、発症後 24 時間以内に撮影された MRI 拡散強調画像において異常所見を呈さない症例が、全体の 31% にも上っていた。小脳梗塞に限ったことではないが、発症の仕方を含めた現病歴と神経学的所見が最も重要であり、画像所見が陽性でなくとも脳血管障害の可能性を常に考慮することが肝要と考えられる⁸⁾。

本研究から、小脳梗塞の患者は必ずしも典型的な小脳症状を呈さず、めまいや嘔気などの非特異的な症状を訴えるにとどまる場合があるということが示唆された。このような場合で、かつ小脳失調やとくに注視方向性の jerky な眼振を異常所見として検出することができなければ、誤診する可能性が高いことが推測される。神経学的に小脳失調をはじめとした異常所見があ

る場合は当然であるが、嘔気やめまいなどの非特異的な症状が前景に立つ場合でもその原因疾患がはっきりしない場合や、経時的に症状を観察しめまいや嘔気などの症状が自然軽快しない場合は特に、入院させるなどして経過を慎重に観察することが望ましい。そして常に小脳梗塞や小脳出血の可能性を考慮するべきである。CT はもちろん特に超急性期に MRI 拡散強調画像で異常所見が見られないことは、必ずしも小脳梗塞であることを否定しないため、注意が必要である。平素脳卒中を診療する立場にある医師が以上の点を意識するのはもちろんのこと、救急外来で診療することのあり得る医師すべてがそのような意識を持つよう、啓発していく必要がある。今後もこのような症例の集積を継続し、小脳梗塞を伴うめまいと伴わないめまいを比較し、小脳梗塞を伴うめまいの臨床的特徴(神経症候以外の特徴も含め)を検討し、その情報を初診医に提供して啓発することが必要だと思われる。

*第 34 回日本脳卒中学会総会時 座長推薦論文

文 献

- 1) Macdonell RAI, Kalmins RM, Donnan GA: Cerebellar infarction: natural history, prognosis, and pathology. *Stroke* 18: 849-855, 1987
- 2) Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F: The Lausanne stroke registry. *Stroke* 19: 1083-1092, 1988
- 3) Tohgi H, Takahashi S, Chiba K, et al: Cerebellar infarction. Clinical and neuroimaging analysis in 293 patients. *Stroke* 24: 1697-1701, 1993
- 4) 益田陽子, 内山真一郎, 岩田 誠: 小脳梗塞の臨床的検討. *東女医大誌* 78: E163-E168, 2008
- 5) Savitz SI, Caplan LR, Edlow JA: Pitfalls in the Diagnosis of Cerebellar Infarction. *Acad Emerg Med* 14: 63-68, 2007
- 6) Simmons Z, Biller J, Adams HP Jr, et al: Cerebellar infarction: comparison of computed tomography and magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 19: 291-293, 1986
- 7) Oppenheim C, Stanescu R, Dormont D, et al: False-negative diffusion-weighted MR findings in acute ischemic stroke. *Am J Neuroradiol* 21: 1334-1340, 2000
- 8) Edlow JA, Newman-Toker DE, Savitz SE: Diagnosis and initial management of cerebellar infarction. *Lancet Neurol* 7: 951-964, 2008

Abstract

Clinical problems in the initial diagnosis of cerebellar infarction

Tsukasa Saito, M.D.¹⁾, Hitoshi Aizawa, M.D., Ph.D.¹⁾, Jun Sawada, M.D., Ph.D.¹⁾,
Yoko Aburakawa, M.D., Ph.D.³⁾, Takayuki Katayama, M.D., Ph.D.¹⁾, Naoyuki Hasebe, M.D., Ph.D.¹⁾,
Yoshimitsu Hayashi, M.D.²⁾, Ryogo Anei, M.D.²⁾, Masao Sato, M.D., Ph.D.²⁾
and Akira Hodotsuka, M.D., Ph.D.²⁾

¹⁾Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Asahikawa Medical College

²⁾Department of Neurosurgery, Asahikawa Medical College

³⁾Department of Neurology, National Hospital Organization Douhoku Hospital

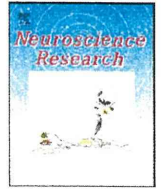
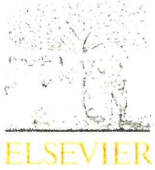
Background and Purpose: On occasion, the diagnosis of cerebellar infarction is initially missed. We analyzed the clinical features of cerebellar infarction to clarify factors contributing to the misdiagnosis of cerebellar infarction.

Methods: Twenty two (4.3%) of 514 stroke patients were diagnosed with cerebellar infarction at Asahikawa Medical College between 2006 and 2008. We examined the clinical features of these patients retrospectively.

Results: Eight patients (36.4%) presented with no more than one typical cerebellar symptom. Although three patients came to the emergency room of our hospital within three hours of onset, they were not initially diagnosed with stroke but were admitted to a non-neurology ward. All three patients complained mainly of vertigo and did not present with either dysarthria or gait disturbance. Five patients were not initially diagnosed with cerebellar infarction due to the absence of any cerebellar sign.

Conclusion: We emphasize that clinicians should consider the possibility of cerebellar infarction whenever patients complain of vertigo or vomiting only. We recommend that the stroke team be involved in the diagnosis of patients with vertigo or vomiting.

(Jpn J Stroke 32: 133-137, 2010)



Effects of antidepressants on GluR2 Q/R site-RNA editing in modified HeLa cell line

Jun Sawada^{a,1}, Takenari Yamashita^{b,1}, Hitoshi Aizawa^{a,*}, Yoko Aburakawa^a, Naoyuki Hasebe^a, Shin Kwak^b

^a Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan

^b Department of Neurology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2008
Received in revised form 7 March 2009
Accepted 11 March 2009
Available online 25 March 2009

Keywords:

AMPA receptor
GluR2
RNA editing
Adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2)
Antidepressant
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

ABSTRACT

Marked reduction of RNA editing at the glutamine (Q)/arginine (R) site of the glutamate receptor subunit type 2 (GluR2) in motor neurons may be a contributory cause of neuronal death specifically in sporadic ALS. It has been shown that deregulation of RNA editing of several mRNAs plays a causative role in diseases of the central nervous system such as depression. We analyzed the effects of eight antidepressants on GluR2 Q/R site-RNA editing in a modified HeLa cell line that stably expresses half-edited GluR2 pre-mRNA. We also measured changes in RNA expression levels of adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2), the specific RNA editing enzyme of the GluR2 Q/R site, and GluR2, in order to assess the molecular mechanism causing alteration of this site-editing. The editing efficiency at the GluR2 Q/R site was significantly increased after treatment with seven out of eight antidepressants at a concentration of no more than 10 μ M for 24 h. The relative abundance of ADAR2 mRNA to GluR2 pre-mRNA or to β -actin mRNA was increased after treatment with six of the effective antidepressants, whereas it was unchanged after treatment with milnacipran. Our results suggest that antidepressants have the potency to enhance GluR2 Q/R site-editing by either upregulating the ADAR2 mRNA expression level or other unidentified mechanisms. It may be worth investigating the *in vivo* efficacy of antidepressants with a specific therapeutic strategy for sporadic ALS *in view*.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease that affects approximately 1 in 2000 people over their lifetime (Cleveland and Rothstein, 2001). ALS is characterized by a selective loss of upper and lower motor neurons that initiates a progressive paralysis with muscle wasting in mid-life, and is usually fatal within 1–5 years after onset. Approximately 5–10% of all ALS cases are familial, and at least five causal genes have been so far identified in individuals affected with familial ALS (SOD1, ALS2, senataxin, vesicle-trafficking protein/synaptobrevin-associated membrane protein, and TDP-43), although the mechanism underlying motor neuron death of familial ALS pathology has not been elucidated (Rosen et al., 1993; Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001; Chen et al., 2004; Nishimura et al., 2004; Yokoseki et al., 2008; Gitcho et al., 2008; Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Van Deerlin et al., 2008). However, sporadic ALS accounts for the majority of all ALS cases, and one clue to the pathomechanism of sporadic ALS, low

editing efficiency of GluR2 mRNA, has been elucidated (Takuma et al., 1999; Kawahara et al., 2004).

One of the most plausible hypotheses for selective neuronal death in sporadic ALS is excitotoxicity mediated by abnormally Ca^{2+} -permeable α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors, a subtype of ionotropic glutamate receptor (GluR) (Kwak and Kawahara, 2005; Carriedo et al., 1996; Lu et al., 1996). The contribution of excessive Ca^{2+} influx through glutamate receptors to the death of motor neurons is the basis for the recent suggestion that deficient GluR2 Q/R site-RNA editing might play a role in ALS (Kawahara et al., 2004; Kwak and Kawahara, 2005). A decrease or loss of RNA editing function occurring specifically in motor neurons could lead to AMPA-channels highly permeable to Ca^{2+} , mimicking or exacerbating the overexcitation of glutamate receptors due to excitatory amino acid transporter loss. The Ca^{2+} conductance of AMPA receptors differs markedly depending on whether the GluR2 subunit is a component of the receptor. AMPA receptors that contain at least one GluR2 subunit have low Ca^{2+} conductance, whereas those lacking a GluR2 subunit are Ca^{2+} permeable (Hollmann et al., 1991; Verdoorn et al., 1991; Burnashev et al., 1992). These properties of GluR2 are generated post-transcriptionally by RNA editing at the glutamine/arginine (Q/R) site in the putative second membrane domain, during which the glutamine codon is substituted by an arginine

* Corresponding author. Tel.: +81 166 68 2442; fax: +81 166 68 2449.

E-mail address: amc62neu@asahikawa-med.ac.jp (H. Aizawa).

¹ Both these authors contributed equally to this study.

codon (Verdoorn et al., 1991; Burnashev et al., 1992). AMPA receptors containing the unedited form of GluR2Q have high Ca^{2+} permeability in contrast to the low Ca^{2+} conductance of those containing the edited form of GluR2R (Burnashev et al., 1995; Swanson et al., 1997). Editing of the GluR2 Q/R position was inefficient in a subset of motor neurons in sporadic ALS, whereas it was completely efficient in all the motor neurons of control cases (Takuma et al., 1999; Kawahara et al., 2004). This finding indicates that abnormal editing may be a contributory cause of neuronal death specifically in sporadic ALS.

A-to-I RNA editing is catalyzed by adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) (Bass, 2002; Keegan et al., 2001; Gott and Emeson, 2000; Maas et al., 2003). An association between the level of ADAR type 2 (ADAR2) mRNA expression and editing efficiency at the GluR2 Q/R site has been demonstrated in human brain white matter (Kawahara et al., 2003). Hence, the expression level of ADAR2 mRNA is one factor determining the efficiency of GluR2 Q/R site-editing, although the nonlinear correlation suggests that another factor or factors may be also involved in the regulation of editing activity (Kawahara et al., 2004).

Several lines of evidence suggest an association between major psychiatric disorders and the pattern of RNA editing at several known A-to-I positions in the serotonin (5-HT)_{2c} receptor mRNA (Dracheva et al., 2003; Niswender et al., 2001; Iwamoto and Kato, 2003; Sodhi et al., 2001; Gurevich et al., 2002a). Furthermore, one research group reported that the extent of editing was altered at some of the A-to-I positions in glutamate receptors mRNAs in the pre-frontal/cortex and hippocampus of rats after a continuous 2-week-treatment with antidepressants (Barbon et al., 2006).

Based on the evidence showing that antidepressant drugs affect the function of AMPA/kainite (KA) receptors (Barbon et al., 2006), we postulated that antidepressants had the potency to modulate GluR2 Q/R site-editing, thereby becoming a potential therapy for ALS. We established methods to analyze editing levels at the GluR2 Q/R site using a modified HeLa cell line, which stably expresses the half-edited GluR2 pre-mRNA (TetHeLaG2m cell). We investigated the abilities of three kinds of antidepressants, i.e., a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), serotonin noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI), and tricyclic antidepressant, to upregulate the GluR2 Q/R site-editing using a newly developed modified HeLa cell line (TetHeLaG2m).

2. Materials and methods

2.1. Generation of HeLa cell line stably expressing GluR2 mini-gene using Tet-on gene expression system (TetHeLaG2m cell line)

The GluR2 mini-gene was designed to include the Q/R site in exon 11 and its exon complementary sequence in the adjacent intron 11 of human GluR2 pre-mRNA in order to evaluate the efficacy of A-to-I editing by ADAR2. The regions of GluR2 pre-mRNA including the sequence between exon 11 and intron 11 (5'-PCR) and the sequence between intron 11 and exon 12 (3'-PCR) were separately amplified by PCR (Fig. 1A). For each PCR, the following primer pairs were used: for the 5'-PCR, 5'-AAAAACGCGTATGAAAGCTGATATTGCAATTGCTC-CAT-3' and 5'-TGTATCATGAAAGGCACCCGCTCCACTAGT-3'; for the 3'-PCR, 5'-TGTTAATGATTTCAGTTTCATTAAGT-3' and 5'-ATAT-TACGCGTCTACCTGAAAACTCTTTAGTGGAGCCA-3'. Each PCR amplification began with a 10-min denaturation at 95 °C, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 68 °C for 90 s. The resulting PCR products were digested by MluI, which recognizes the exon 11-intron 11 junction of the 5'-PCR product and the intron 11-exon 12 junction of the 3'-PCR product. Then, both PCR-amplified fragments were ligated at the SpeI restriction sites in intron 11. The ligated products were inserted into the Tet-on pTRE-Tight Vector (Clontech, Palo Alto, CA, USA), and

then transfected into Tet-on HeLa cells (Clontech). Tet-on HeLa cells were transfected with the GluR2-mini gene pTRE-Tight Vector and a linear puromycin marker (Clontech). Then, TetHeLaG2m cells were isolated from the puromycin-resistant clones.

2.2. Cell culture and drug treatment

TetHeLaG2m cells were seeded at 1×10^7 cells/well in 10 cm plastic wells, cultured in MEM- α medium (Wako, Tokyo, Japan) supplemented with 10% Tet System-approved fetal bovine serum, 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin (both Clontech), 100 IU/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (Invitrogen) and incubated in a 5% CO_2 atmosphere. After growing to confluence, TetHeLaG2m cells were plated at 2×10^6 cells/well in 6-well plates.

Culture cells were incubated with 0–10 μM of antidepressant for 24 h and then harvested for RNA extraction. The antidepressants used in this study were SSRIs (fluvoxamine, fluoxetine, paroxetine), SNRIs (milnacipran, reboxetine), and tricyclic antidepressants (amitriptyline, desipramine, imipramine); these drugs were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Fluvoxamine and paroxetine were dissolved in dimethyl sulfoxide, while the other drugs were dissolved in distilled water.

2.3. RNA extraction and reverse transcription

RNA was extracted from the cells in each well using an RNeasy mini kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). One microgram of total RNA was incubated at 70 °C for 10 min with 500 ng of Oligo(dT). First-strand cDNA was synthesized from the total RNA with 4 μL of 5 \times first-strand buffer, 2 μL of 0.1 M DTT, 4 μL of 2.5 mM dNTPs, 1 μL of RNase inhibitor (Toyobo, Tokyo, Japan), and 1 μL of SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) in a final volume of 20 μL . The reverse transcription started with incubation at 42 °C for 60 min, followed by incubation at 51 °C for 15 min, and was stopped by heating to 72 °C for 15 min.

2.4. Nested polymerase chain reaction and restriction digestion

To determine the editing efficiency at the Q/R site of GluR2 in TetHeLaG2m cells, nested PCR products including the Q/R site were digested with restriction enzyme BbvI (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) as previously described (Kawahara et al., 2003). In brief, 2 μL of cDNA were subjected first to PCR in duplicate in a reaction mixture of 50 μL containing 10 μM each primer, 4 μL of 2.5 mM dNTPs, 5 μL of 10 \times PCR buffer, and 0.5 μL of Gene Taq (Nippon Gene, Tokyo, Japan). The PCR amplification began with a 2-min denaturation step at 95 °C, followed by 20 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 66 °C for 30 s and extension at 68 °C for 60 s. Nested PCR was conducted on 2 μL of the first PCR product under the same conditions with the exception of the number of PCR cycles (30 cycles). For each PCR, the following primers were used (amplified product lengths are also indicated): for the first PCR (352 bp), F1 (5'-TTCCTGGTCAGCAGATTTAGCC-3') and R1 (5'-GCAACATTC AAGAACATTTGTT-3'), and for the nested PCR (200 bp), F2 (5'-TCTGGTTTTCTTGGGTGCC-3') and R2 (5'-CCGAAGCTAAGAGGATGTCCTTC-3').

After gel purification using the Zymoclean Gel DNA Recovery Kit according to the manufacturer's protocol (Zymo Research, Orange, CA, USA), PCR products were quantified using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). An aliquot (0.5 μg) was then incubated at 37 °C for 12 h with 10 \times restriction buffer and 2 U of BbvI in a total volume of 20 μL and inactivated at 65 °C for 30 min.

The PCR products had one intrinsic BbvI recognition site, whereas the products originating from unedited GluR mRNA had

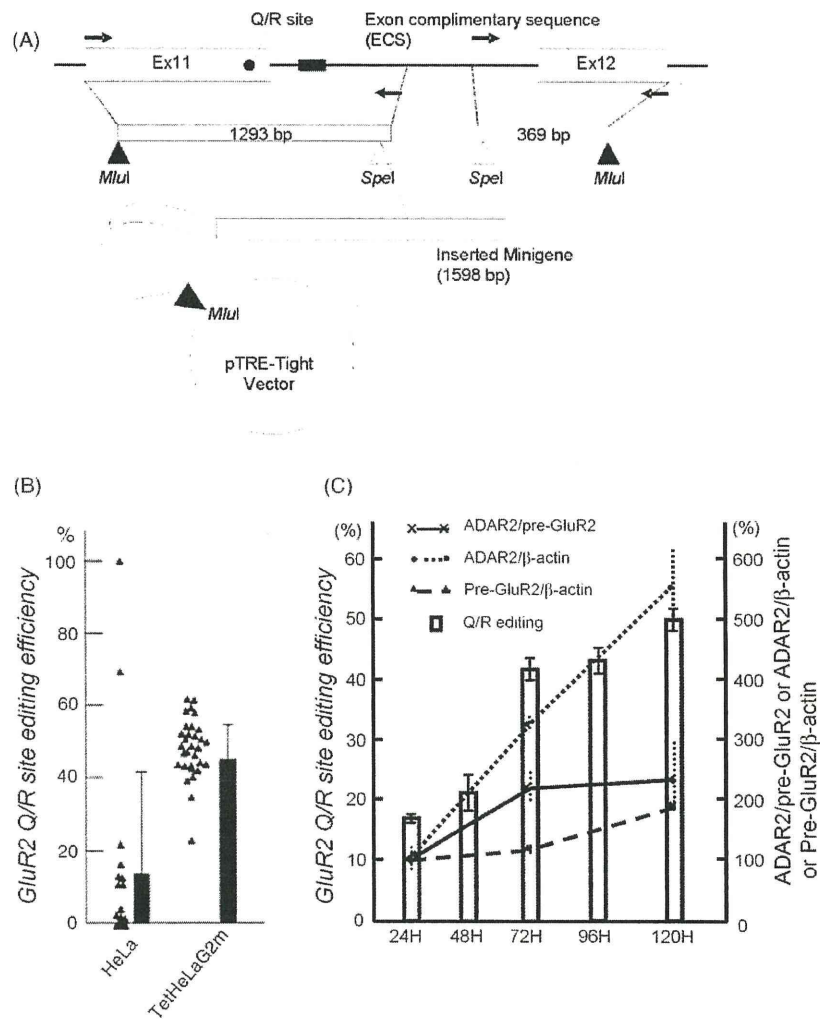


Fig. 1. TetHeLaG2m cell line. (A) Schematic figure of the GluR2 minigene with pTRE-tight vector. (B) Editing efficiencies at the Q/R site of GluR2 minigene pre-mRNA in conventional HeLa and TetHeLaG2m cell lines cultured in a dish for 48 h. Each symbol represents the extent of Q/R site-editing of GluR2 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 (5×10^5 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.

an additional recognition site (Fig. 2). Thus, in TetHeLaG2m cells, restriction digestion of the PCR products originating from edited GluR2 mRNA should produce two bands at 129 and 71 bp, whereas those originating from unedited GluR2 mRNA should produce three bands at 91, 38, and 71 bp. As the 71-bp band would originate from both edited and unedited mRNA but the 129-bp band would originate from only edited mRNA, we quantified the molarity of the 129- and 71-bp bands using the 2100 Bioanalyser and calculated the editing efficiency as the ratio of the former to the latter for each sample.

2.5. Standard preparation for quantitative polymerase chain reaction

To prepare an internal standard for quantitative PCR of TetHeLaG2m cells, we inserted the genes we aimed to estimate into the plasmid vector. Total RNA was extracted from conventional HeLa cells by using an RNAspin Mini kit (GE Healthcare) and the cDNA was synthesized from the total RNA with Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Biosciences). Gene-specific PCR products of GluR2, ADAR2, and β -actin were amplified from the cDNA with the primers noted in Table 1. Each PCR was done using the

following program: the PCR amplification began with a 10-min denaturation step at 95 °C, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 68 °C for 40 s. Using the primers (Table 1) shown in the previous report (Nishimoto et al., 2008), 2 μ L of cDNA extracted from HeLa cells (human control) was subjected to PCR with 1 μ L of Advantage 2 Polymerase mix (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA). After gel purification, PCR products were subcloned using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen), and clones containing inserts were sequenced with an ABI PRISM 3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The concentration of each standard plasmid was measured spectrophotometrically at 260 nm (Nano Drop™ ND-1000; Nano Drop Technologies, Wilmington, DE). We prepared standard solutions by serial dilutions of the sample ranging from 10^{-11} to 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} and 10^{-6} μ g per 1 μ L.

2.6. Real-time quantitative polymerase chain reaction

PCR was performed on TetHeLaG2m cells using a LightCycler System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The PCR primers and probes were designed from the cDNA sequences of

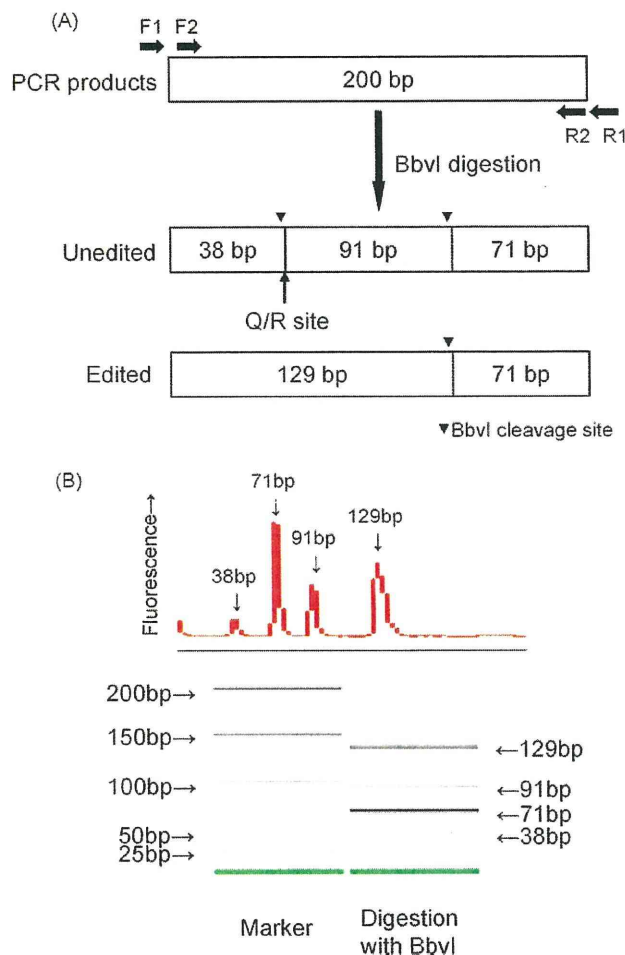


Fig. 2. Method of detecting editing efficiency at the Q/R site of GluR2. (A) Scheme for detecting editing efficiency at the Q/R site of GluR2. Open bars represent nested PCR products. Intrinsic BbvI recognition sites are indicated by vertical solid arrowheads. The sizes of the DNA fragments generated 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.

GluR2, ADAR2, and β -actin (as an internal control), which were obtained from GenBank (Table 1). The PCR primers and probes were designed from the cDNA sequences of GluR2, GluR2 mini-gene (pre-GluR2), ADAR2, and β -actin (as an internal control), which were obtained from GenBank (Table 1). A set of standard and cDNA samples was amplified in duplicate in a master mixture (20 μ L total volume) comprising 2 μ L of 5 \times TaqMan DNA polymerase (Roche Diagnostics) containing the reaction mix, 0.5 μ M each primer, 0.1 μ M Universal probes (Roche Diagnostics). Herring sperm DNA solution was coamplified as a negative control in each series of reactions. The reactions started with incubation for 10 min at 95 $^{\circ}$ C to activate TaqMan DNA polymerase. Templates were amplified by 60 cycles of denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 10 s and primer annealing at 60 $^{\circ}$ C for 30 s. This was followed by fluorescence acquisition and extension at 72 $^{\circ}$ C for 1 s.

2.7. Statistical analysis

For the value of GluR2 Q/R site-editing efficiency, one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Dunnett's

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

	Oligonucleotide sequence
GluR2	
Forward primer	5'-ATGCGATATTTCCCAAGA-3'
Reverse primer	5'-CAGTCAGGAAGGCAGCTAAGT-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'-GTGTAAGCACGCGTTGTACTG-3'
Reverse primer	5'-CGTAGTAAGTGGGAGGGAACC-3'
Universal Probe Library probe #62	5'-GCTGGATG-3'
β-Actin	
Forward primer	5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'
Reverse primer	5'-CCAGAGCGCTACAGGGATAG-3'
Universal Probe Library probe #64	5'-CCAGGCTG-3'

multiple comparison test, was used to compare the control group with antidepressant-treated groups, and Steel's test was used for multiple comparison to compare the mRNA expression levels of the treated group with the control group in the statistical analysis. Results are given as the mean value \pm standard error.

3. Results

3.1. Establishment of HeLa cell line (TetHeLaG2m) suitable for measurement of editing activity at GluR2 Q/R site

To measure RNA editing activity at the GluR2 Q/R site, we developed a double-stable HeLa cell line carrying a GluR2 mini-gene, which included human GluR2 exon 11, a part of intron 11, and exon 12, using Tet-on system (Fig. 1A). In contrast to HeLa cell line in which the editing efficiency at the GluR2 Q/R site varied widely from 0% to 100%, this cell line (TetHeLaG2m) stably expressed the pre-mRNA of GluR2-mini gene with both edited and unedited Q/R sites in nearly the same amounts after culture in vitro for 48 h (Fig. 1B). The extent of RNA editing at this site increased linearly with the length of culture until the cells were confluent in 6-well plates (Fig. 1C). Because the expression level of pre-GluR2 mRNA relative to β -actin mRNA in TetHeLaG2m cells was 100-fold high than that in HeLa cells ($2.0E-05 \pm 2.9E-06$ ($n = 18$) and $2.6E-03 \pm 2.4E-04$ ($n = 12$) in HeLa cells and TetHeLaG2m cells, respectively), it is likely that the majority of pre-GluR2 mRNA in Fig. 4 were derived from the GluR2 mini gene in TetHeLaG2m cells.

3.2. Effect of antidepressant treatment on GluR2 Q/R site-editing

We investigated the editing efficiency at the GluR2 Q/R site in TetHeLaG2m cells after antidepressant treatment. The RNA editing level depends on culture time, but the variation of the editing level at given culture time is small among cells in sister culture (Fig. 1C). GluR2 Q/R site-editing was increased after incubation with each antidepressant except reboxetine. The effects of these drugs appeared to be dose-dependent, and the extents to which they increased editing were most marked after treatment with 10 μ M milnacipran (Fig. 3D) and imipramine (Fig. 3G) (each about 40%), followed by 10 μ M fluvoxamine (Fig. 3A), fluoxetine (Fig. 3B), paroxetine (Fig. 3C), and desipramine (Fig. 3G) (about 20%), and 1 and 10 μ M amitriptyline (Fig. 3F) and 1 μ M imipramine had some effect (about 10%).

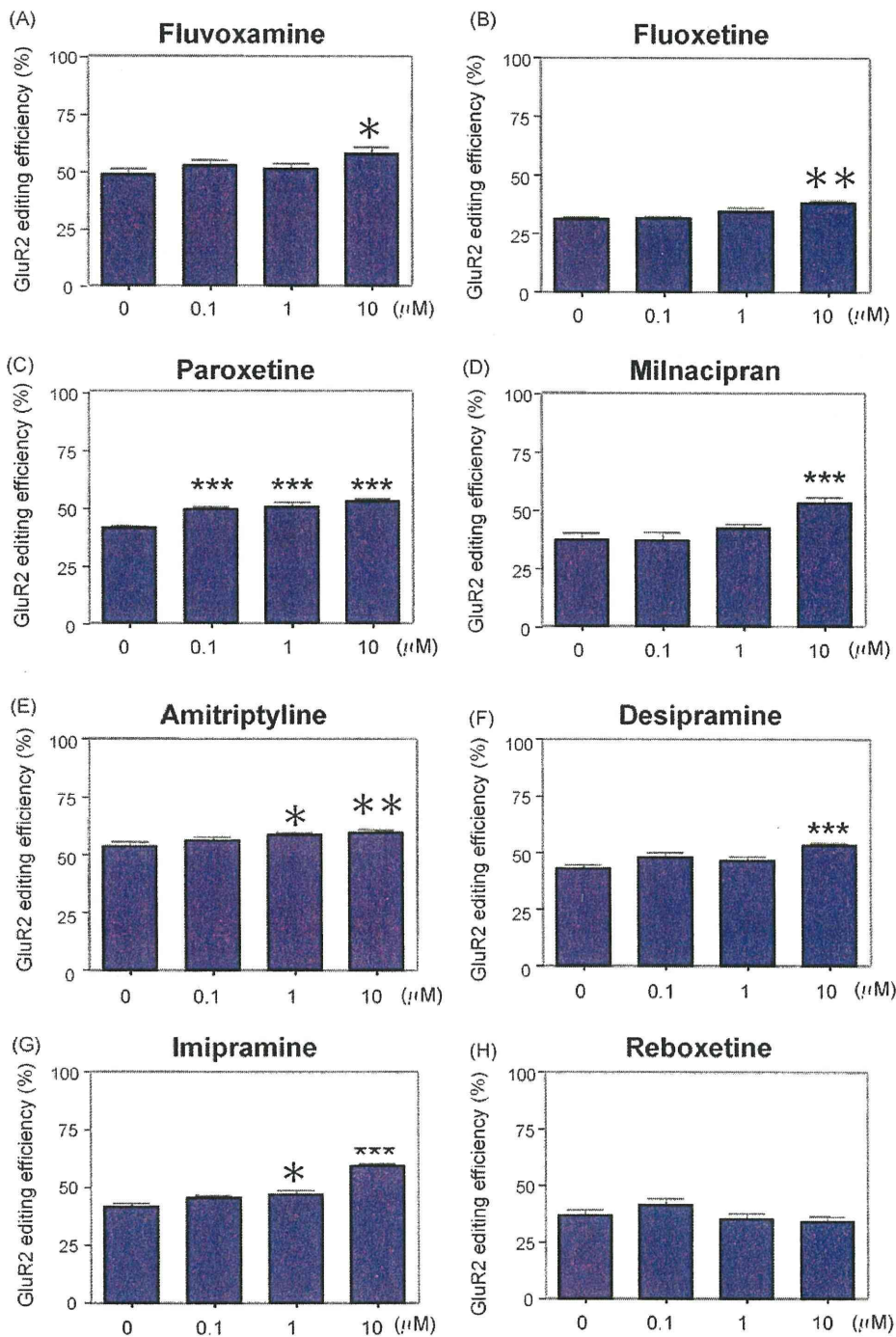


Fig. 3. Editing extent of GluR2 Q/R site. Editing efficiency in TetHeLaG2m cells after treatment with antidepressants (0–10 μ M) for 24 h is expressed as mean \pm SEM ($n = 5-8$). Statistical analysis was performed by the one-way ANOVA test followed by Dunnett's multiple comparison test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$). GluR, glutamate receptor; Q, glutamine; R, arginine; ANOVA, analysis of variance.

3.3. Changes in expression levels of ADAR2 mRNA, GluR2 mRNA, and GluR2 pre-mRNA

Because seven out of the eight antidepressants we examined (fluvoxamine, fluoxetine, paroxetine, milnacipran, amitriptyline, desipramine, and imipramine) significantly increased the GluR2 editing efficiency, we next investigated the relative changes in the expression levels of ADAR2, GluR2 mRNAs, and GluR2 pre-mRNA normalized to the expression level of β -actin mRNA before and after treatment with the above drugs. We also

calculated the ratios of the amount of ADAR2 mRNA to that of GluR2 pre-mRNA in order to assess changes in the enzyme-substrate ratio after treatment with these antidepressants (Fig. 4).

The expression of ADAR2 mRNA was higher than that of the control group after treatment with 1 and 10 μ M of fluvoxamine and 0.1 and 10 μ M of imipramine (Fig. 4A and G), whereas it was lower than that of the control group after treatment with milnacipran (0.1 and 10 μ M) (Fig. 4D). The other drugs did not alter the amount of ADAR2 mRNA significantly (Fig. 4B, C, E, and F).

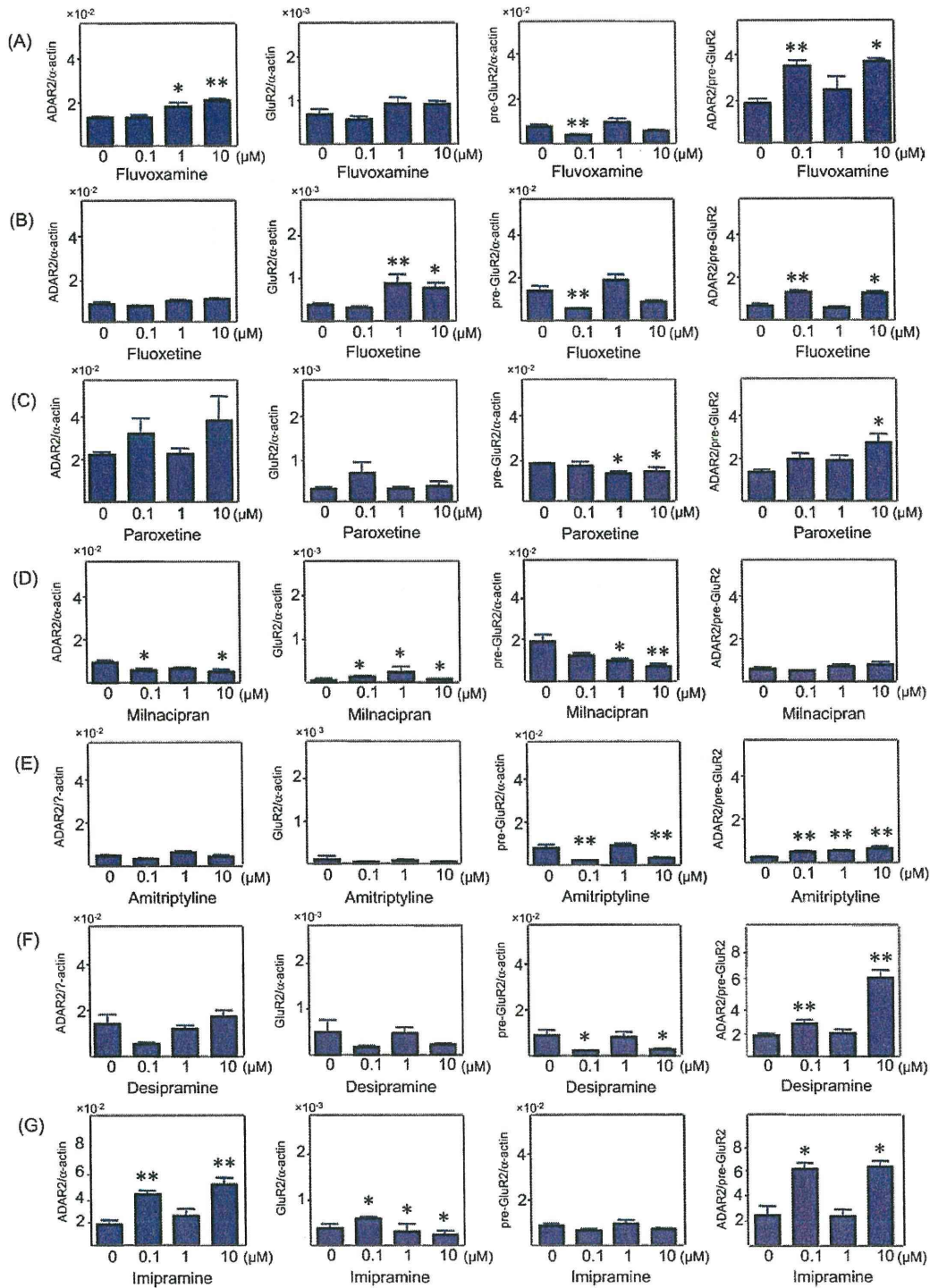


Fig. 4. Expression levels of ADAR2 mRNA, GluR2 mRNA and GluR2 pre-mRNA. Amounts of RNA that were upregulated by seven out of eight antidepressants that upregulated by GluR2 Q/R site-editing (A–G) were quantitatively analyzed. The amounts of ADAR2 mRNA, GluR2 mRNA, and GluR2 pre-mRNA are expressed as values relative to that of β -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 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$). GluR, glutamate receptor; ADAR, adenosine deaminase acting on RNA; Q, glutamine; R, arginine.

The expression of GluR2 mRNA was higher after treatment with 1 and 10 μ M of fluoxetine and 0.1, 1, and 10 μ M of milnacipran compared with that of the control group (Fig. 4B and D). In the imipramine-treated group, the expression of GluR2 mRNA with 0.1 μ M of imipramine was higher than that of the control group, but at concentrations of 1 μ M and 10 μ M it was lower than that of

the control group (Fig. 4G). The treatment with fluvoxamine, paroxetine, amitriptyline, and desipramine did not alter the amount of GluR2 mRNA significantly (Fig. 4A, C, E, and F).

The expression of GluR2 pre-mRNA was decreased by 70% after treatment with paroxetine (1 and 10 μ M) (Fig. 4C), and by 20% after treatment with amitriptyline (0.1 and 10 μ M) (Fig. 4E).