

平成 22 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890054
 研究課題名（和文） 孤発性筋萎縮性側索硬化症の剖検脳脊髄組織における RNA 編集酵素活性異常の解析
 研究課題名（英文） Analysis of RNA editing enzyme abnormality in the spinal motor neurons of sporadic amyotrophic lateral sclerosis
 研究代表者
 日出山 拓人 (HIDEYAMA TAKUTO)
 東京大学・保健・健康推進本部・助教
 研究者番号：30511456

研究成果の概要（和文）：AMPA 受容体を構成し、Ca²⁺透過性を決定するサブユニット GluR2 は、RNA 編集酵素 ADAR2 が働くことにより、正常脊髄運動ニューロンでは編集型の GluR2 のみを発現し、未編集型 GluR2 の発現はみられない。私たちは 29 例の様々な表現型を持つ孤発性筋萎縮性側索硬化症患者剖検脊髄を検討した結果、全例で未編集型 GluR2 を発現する運動ニューロンが出現していることを見出し、その原因として ADAR2 活性低下が起きていることを示した。

研究成果の概要（英文）： In humans, all GluR2 mRNAs in neurons are completely edited at the Q/R site and the majority of AMPA receptors have GluR2 in their composition, making AMPA receptors Ca²⁺-impermeable. RNA editing at this site is specifically catalyzed by adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) in mammals including humans. We analyzed the expression levels of ADAR2 mRNA and its activity at the GluR2 Q/R site on laser-captured motor neurons from 29 cases with sporadic ALS compared with those from normal subjects. We demonstrate that inefficient GluR2 Q/R site-editing occurs in a significant proportion of motor neurons in all the ALS cases examined. Universal reduction of ADAR2 in motor neurons is likely a pathognomonic molecular change in sporadic ALS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症（ALS）、RNA 編集異常、剖検脳脊髄組織、GluR2 Q/R 部位、ADAR2

1. 研究開始当初の背景

孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因

にはグルタミン酸受容体サブタイプである AMPA (α -3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole

propionic acid) 受容体を介する神経細胞死のメカニズムが働くことを示唆する知見が蓄積しており、特に運動ニューロンは AMPA 受容体を介する神経細胞死に脆弱であることが知られていた。AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性は編集型 GluR2 サブユニットの有無により決まり、GluR2 を 1 個以上含む AMPA 受容体は Ca^{2+} 非透過性だが、GluR2 を含む AMPA 受容体であっても GluR2 に転写後に生ずべき Q/R 部位の RNA 編集を受けない未編集型 GluR2 を含む AMPA 受容体は Ca^{2+} 透過性である。Kwak らは、孤発性 ALS 運動ニューロン組織での検討から、GluR2 Q/R 部位に RNA 編集が起らない未編集型の GluR2 増加が孤発性 ALS 運動ニューロンに疾患特異的、細胞選択的に生じていることを見出し、しかも、GluR2 mRNA の発現量には変化がないことから、孤発性 ALS では、未編集型 GluR2 を含む AMPA 受容体割合が増加することが運動ニューロン死の病因に深く関連する分子変化であることを報告した。この分子変化が AMPA 受容体チャネルの Ca^{2+} 透過性亢進により神経細胞死を引き起こす直接原因になり、しかも変異 SOD1 関連家族性 ALS を含めた他の神経変性疾患には生じない高い疾患特異性をもつことから孤発性 ALS の運動ニューロン死を引き起こす直接原因であると考えられる。

Ca^{2+} 透過性 AMPA が緩徐な運動ニューロン死を引き起こす可能性は、人工的に作成した Ca^{2+} 透過性 AMPA レセプター・サブユニット GluR-B (N) ミニ遺伝子を導入した変異マウスは、痙攣などを起こさずに 12 ヶ月間生存するが、脊髄運動ニューロンの減少を示すことによっても示されている。とくに Ca^{2+} 透過性 AMPA レセプターを介するニューロン死が緩徐進行性であることは注目に値し、孤発性 ALS の運動ニューロンに見出された GluR2 の分子異常を生ずる分子メカニズムの解明は孤発性 ALS の病因解明に近づくものと考えられる。

GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は RNA 編集酵素 adenosine deaminase acting on RNA 2 (以下 ADAR2) により特異的に触媒されるため、孤発性運動ニューロンでは ADAR2 の活性が低下していると考えられる。申請者らは、ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウスを新たに開発し、運動ニューロンにおける ADAR2 欠損が、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常、緩徐な運動ニューロン死を引き起こすことを見出している (Hideyama T, et al. Abstr Neurosci 2008; 745. 17.). したがって、孤発性 ALS 運動ニューロンでも ADAR2 活性が低下していると考えられるが、少数例の孤発性 ALS 前角組織で、ADAR2 mRNA 発現量が低下していることを示すデータが得られたのみであった。最近、Kwak らにより、ADAR2 の特異的な基質が cytoplasmic FMRP interacting

protein 2 (CYFIP2) mRNA の K/E 部位に見出され、しかも CYFIP2 mRNA の発現が運動ニューロンを含む中枢神経に豊富であることが報告された。したがって、この RNA 編集部位は ADAR2 活性を *in vivo* で測定するための有用なツールになると考えられる。

2. 研究の目的

上述した Kwak らによる研究成果から、私たちは、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は孤発性 ALS 運動ニューロンに生じている特異的分子異常であり、この分子異常は ADAR2 の酵素活性が低下しているためであると考えた。この仮説を検討するために、疾患特異性の検討として、孤発性 ALS の病型を問わず、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常が認められるのかどうか検討する。さらに、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集に特異的に関わる ADAR2 活性低下の有無を検討するために、ADAR2 mRNA 発現量、GluR2 Q/R 部位以外の ADAR2 基質の編集率を測定する。

この検討により、様々な表現型を取る孤発性 ALS に GluR2 Q/R 部位の編集異常という共通の分子異常が生じているかどうか、その原因が GluR2 Q/R 部位を特異的に編集する RNA 編集酵素 ADAR2 の活性低下によるものかどうか、を明らかにすることができる。

3. 研究の方法

前述したように、少数例の ALS 脊髄前角組織、単一脊髄運動ニューロンでの検討で AMPA 受容体サブユニット GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率が低下していることが分かった。

未解決である以下の 2 点

(1) この分子変化は ALS with dementia を含む、様々な表現型をとる孤発性 ALS 全てに共通するのか、

(2) GluR2 Q/R 部位の編集異常は RNA 編集酵素である ADAR2 活性低下によるものか、について検討した。

(1) については、多数例の孤発性 ALS 症例の検討により、病型や罹病期間、発症年齢を問わず孤発性 ALS と診断された症例全てに共通する分子変化かどうかを明らかにする。組織として凍結剖検脳脊髄組織 5 例 (正常対照群) から脊髄前角組織 (10mg 前後) を切り出し、Trizol に保存し回収する。同様にして、凍結剖検孤発性 ALS 脊髄組織 29 例 (四肢型 18 例、球麻痺型 8 例、ALS-痴呆 2 例、Basophilic inclusion body が出現する若年発症例 1 例) の脊髄前角組織を切り出し、Trizol に保存し回収する。回収したサンプルから、total RNA を取り出し、RT-PCR 法を用い、逆転写することによって cDNA を作成する。特異的プライマーを作成し、各サンプル

中のGluR2 Q/R部位をcDNA 10 μ l用いてPCRで増幅し、mRNAの編集率を制限酵素を利用した系（バイオアナライザー：アジレント社）で算出する。正常対照群と孤発性ALS群間のGluR2 Q/R部位の編集率について比較検討する。同サンプルからADAR2 mRNA発現量をreal-time PCR法（Lightcycler 480、ロシュ社）で定量する。

(2)については、GluR2 Q/R部位のRNA編集に特異的に関わるADAR2活性低下の有無を検討するために、まず、組織として凍結剖検脳脊髄組織5例（正常対照群）から脊髄運動ニューロンを1個ずつ、Laser microdissection system（ライカ社製）を使って、切り出し、シングルセルサンプルとしてTrizol保存し回収する。回収したシングルセルから、total RNAを取り出し、RT-PCR法を用い、逆転写することによってcDNAを20 μ l作成する。特異的プライマーを作成し、各サンプル中のGluR2 Q/R部位をcDNA 10 μ l用いてPCRで増幅し、mRNAの編集率を制限酵素を利用した系（バイオアナライザー、アジレント社）で算出する。残ったcDNAをプールし、ADAR2 mRNA発現量をreal-time PCR法（Lightcycler 480、ロシュ社）で定量する。同様に、平成20年度の組織の検討でシングルセルサンプルとして使用可能と判断された凍結剖検孤発性ALS脊髄組織10~15例を予定（四肢型、球麻痺型、痴呆を伴うALS（ALS-D）、Basophilic inclusion bodyを含む若年発症例のそれぞれを含む）から脊髄運動ニューロンも1個を単位として切り出し、回収する。ALS運動ニューロンに発現しているGluR2 mRNAのQ/R部位編集率も同様にRT-PCR法を使ってcDNAを作成し、PCRで増幅、制限酵素による断片の定量を利用した系で編集率を算出。ADAR2 mRNA発現量もreal-time PCR法で定量する。

4. 研究成果

グルタミン酸受容体サブユニットであるGluR2のRNA編集異常が疾患特異的に生じていることが、少数例の孤発性ALS例と疾患対照、正常対照例の剖検組織の検討から明らかにされている。孤発性ALSの運動ニューロン死を引き起こす分子メカニズムを明らかにするため、GluR2 Q/R部位の編集異常の疾患特異性を、様々な孤発性ALSの病型で検討し、この分子変化の上流の分子異常と考えられる、RNA編集酵素adenosine deaminase acting on RNA 2（ADAR2）の活性低下の有無を、脊髄運動ニューロン（シングルセル）を用いて検討した。

平成20年度の組織の検討でシングルセル

サンプルとして使用可能と判断された凍結剖検正常対照群5例及び孤発性ALS群約20例（四肢型、球麻痺型、ALS-D、Basophilic inclusion bodyを含む若年発症例のそれぞれを含む）から脊髄運動ニューロン1個を単位として切り出し、GluR2 Q/R部位編集率を算出した。それぞれの群についてプールした運動ニューロンを用いてADAR2 mRNA発現量もreal-time PCR法で定量した。その結果、正常対照群では100個以上の全ての運動ニューロンで編集率は100%に保たれていたが、孤発性ALSと診断された症例においては、全症例で編集率が100%未満に低下した運動ニューロンが認められ、ADAR2 mRNA発現量も正常対照に比し、有意に低下していた。

以上から、GluR2 Q/R部位のRNA編集異常は様々な表現型をとる孤発性ALS全てに共通することが、明らかになり、ADAR2活性低下が原因である可能性が示唆された。本研究から、ADAR2活性低下を回復させることによりALSの特異的治療の開発につながることを期待される。

GluR2 Q/R部位のRNA編集異常という観点からADAR2活性低下が孤発性ALSの病因であることを主軸に研究をしているのは、世界中でも私たちのグループに限られ、高いオリジナリティがある。

このように、患者組織に見出された、病因と直結する活性分子の異常を生ずるメカニズムを解明することは、治療の標的を特定することで、運動ニューロン死の阻止、機能回復につながる薬剤、遺伝子治療など特異的な分子治療の開発につながる可能性が高い。運動ニューロン特異的にどうして選択的な神経細胞死が起こるのか、の分子メカニズムの解明は他の神経変性疾患の治療法の開発に繋がる可能性がある。同時に、共通した現象であれば、このRNA編集酵素の異常をバイオマーカーとして用いることも期待できる。

また、RNA編集異常という分子変化は私たちのグループが孤発性ALSに特異的に生じていることを示したパイオニアであるが、RNA編集が中枢神経を中心として広汎に行われている生物現象であることを考えると、他のRNA編集部位の異常がALS以外の疾患の原因となっている可能性があり、原因不明の疾患解明に応用できる可能性が高い。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計10件）

1. Hideyama T, Yamashita T, Nishimoto Y, Suzuki T, Kwak S. : Novel etiological and therapeutic strategies for neurodegenerative RNA editing enzyme

- abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *J Pharmacol Sci.*, 査読あり, 113(1), 9-13, 2010
2. Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Katayama T, Hasebe N, Kimura T, Yahara O, Kwak S. : TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol.* 査読あり, In Press, DOI 10.1007/s00401-010-0678-x.
 3. Kwak S, Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H. : AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS. *Neuropathology*, 査読あり, 30(2):182-8, 2010
 4. 日出山拓人, 山下雄也, 郭伸 : グルタミン酸受容体と運動ニューロン変性, 査読無し, 実験医学, 745-753, 2010
 5. 辻省次, 岩田淳, 古和久朋, 日出山拓人, 石浦浩之, 代田悠一郎, 長島優 : 臨床医学の展望, 神経病学, 血管系を除く, 査読無し, 日本医事新報, 4484, 46-59, 2010
 6. 日出山拓人, 郭伸 : 臨床に必要な神経薬理・化学 : ALSにおける RNA editing 異常, *Clinical Neuroscience*, 246-7, 2009
 7. Kwak S, Hideyama T, Yamashita T: AMPA receptor-mediated neuronal death in motor neuron diseases. In: *Amino Acid Receptor Research*, Eds. Paley BF, Warfield TE, Nova Science Publishers Inc. NY. 査読あり, 293-310, 2008
 8. Nishimoto Y, Yamashita T, Hideyama T, Tsuji S, Suzuki N, Kwak S: Determination of editors at the novel A-to-I editing positions. *Neurosci Res.* 査読あり, 61(2), 201-6, 2008
 9. 日出山拓人, 郭伸 : 孤発性 ALS と興奮性アミノ酸, *Clinical Neuroscience*, 査読無し, 26 巻 3 号, 303-305, 2008
 10. Hideyama T, Tanaka H, Uesaka Y, Kunimoto M, Miwa A. : Case of primary intraocular central nervous system lymphoma with high interleukin 10 level and positive cytology in cerebrospinal fluid, *臨床神経学*, 査読あり, 第 48 巻 第 6 号, 415-8, 2008

[学会発表] (計 11 件)

1. 日出山拓人, 山下雄也, 相澤仁志, 柿田明美, 高橋均, 辻省次, 郭伸 : 孤発性筋萎縮性側索硬化症と RNA 編集異常, 2010 年 5 月 21 日, 第 51 回神経学会総会, 東京
2. Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Peter H. Seeburg, Takahashi R, Misawa H, Kwak S: RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis, The 20th

International Symposium on MND/ALS, 2009 年 12 月 9 日, Berlin(Germany)

3. Yamashita T, Hideyama T, Kwak S: Analysis of neuronal death pathway in conditional ADAR2 knockout mice (AKAMON), 第 32 回日本神経科学大会 (Neuro2009), 2009 年 9 月 16 日, 名古屋
4. 日出山拓人, 山下雄也, 鈴木岳之, 辻省次, 高橋良輔, 三澤日出巳⁴, Miyoko Higuchi, Peter H. Seeburg³, 郭伸 : 孤発性筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの開発と病態解析. 第 50 回神経学会総会, 2009 年 5 月 15 日, 仙台
5. Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Kimura D, Tsuji S, Higuchi M, Peter H, Seeburg, Takahashi R, Misawa H, Kwak S : RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis, 第 82 回日本薬理学会(招待口演), 2009 年 3 月 18 日, 横浜
6. Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Misawa H, Takahashi R, Suzuki T, Kwak S: Slow neuronal death of motor neurons in sporadic ALS mouse model by RNA editing enzyme ADAR2 knockout mice, 2008 年 11 月 19 日, Washington.D.C (USA)
7. Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Misawa H, Takahashi R, Suzuki T, Kwak S: Slow death of motor neurons in sporadic ALS mouse model by conditional targeting of RNA editing enzyme ADAR2, 19th ALS/MND International Symposium, 2008 年 11 月 4 日, Birmingham(UK),
8. Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Misawa H, Takahashi R, Suzuki T, Kwak S: Mouse model of sporadic ALS by targeting RNA editing enzyme in motor neurons, 6th FENS Forum of European Neuroscience, 2008 年 7 月 14 日, Geneva (Switzerland),
9. Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Misawa H, Takahashi R, Suzuki T, Kwak S: Mouse model of sporadic ALS by abnormality of RNA editing enzyme. 第 31 回日本神経科学大会. 2008 年 7 月 6 日, 東京
10. 日出山拓人, 山下雄也, 辻省次, 高橋良輔, 三澤日出巳, 鈴木岳之, 郭伸 : RNA 編集異常による孤発性 ALS モデルマウスの開発, 第 49 回神経学会総会, 横浜, 2008 年 5 月 15 日, 横浜
11. Kimura D, Hideyama T, Suzuki T, Kwak S: Neuronal death induced by deficient ADAR2 in tamoxifen-driven conditional knockout mice, 第 81 回日本薬理学会, 2008 年 3 月 17 日, 横浜

[図書] (計 2 件)

1. 日出山拓人, 郭伸 : 髄液, 髄液オリゴクローナ

ルバンド, 髄液ミエリン塩基性蛋白, パーフェクトガイド検査値事典, 総合医学社, In press, 2010

2. 日出山拓人, 郭 伸: 孤発性筋萎縮性側索硬化症とAMPA仮説, Annual Review 神経 2008, 中外医学社, 212-21, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日出山 拓人 (HIDEYAMA TAKUTO)
東京大学 保健・健康推進本部 助教
研究者番号: 30511456

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: