

機関番号 : 12601

研究種目 : 基盤研究 (B)

研究期間 : 2007~2009

課題番号 : 19390235

研究課題名 (和文) 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける神経細胞死の調節機構の検討

研究課題名 (英文) Molecular mechanism underlying death of motor neurons in model mice of amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

郭 伸 (KWAK SHIN)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 : 40160981

研究成果の概要 (和文) :

孤発性ALS患者脊髄に生じている疾患特異的分子異常を再現した分子病態モデルマウスAR2 マウスを作成し、この変異マウスの解析により、以下のことを明らかにした。1) GluR2 Q/R 部位のRNA編集 (A-to-I変換) は専らADAR2 により行われる。2) AR2 マウスは緩徐進行性の選択的運動機能障害、運動ニューロンの変性脱落を呈する。3) ADAR2 欠損が緩徐進行性の神経細胞死の直接原因になる。4) その分子メカニズムは、ADAR2 活性低下によりQ/R 部位未編集型GluR2 が発現することであり、AMPA受容体のCa²⁺透過性亢進によると考えられる。ADAR2 欠損によるGluR2 Q/R 部位以外でのRNA編集効率低下は神経細胞死に関与しない。5) 運動ニューロンの内、外眼筋運動ニューロンはADAR2 活性低下による運動ニューロン死に抵抗性が高く、ALSにおける病変の選択性を再現している。以上のように、AR2 マウスは孤発性ALSの分子病態を反映し、表現型もALSに類似することから、ALSの病因解明、治療法開発にとり有用なツールになると考えられる。

研究成果の概要 (英文) :

Inefficient RNA editing of GluR2, a subunit of the L- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor, at the Q/R site is a disease-specific and site-selective molecular abnormality in spinal motor neurons of ALS patients. Adenosine for the Q/R site of GluR2 pre-mRNA is converted to inosine (A-to-I conversion) by the enzyme called adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) and failure to edit this site upregulates the Ca²⁺-permeable AMPA receptors containing Q/R site-unedited GluR2. To mimic the ALS pathogenesis, we generated genetically modified mice (designated as AR2) in which the ADAR2 gene was conditionally targeted in about a half of motor neurons using the Cre/loxP system. These AR2 mice showed a decline in motor function commensurate with the slow death of ADAR2-deficient motor neurons in the spinal cord and cranial motor nerve nuclei. Notably, neurons in nuclei of oculomotor nerves, which often escape degeneration in ALS, were not decreased in number despite of a significant decrease in GluR2 Q/R site-editing. All cellular and phenotypic changes in AR2 mice were prevented when the mice carried endogenous GluR2 alleles engineered to express edited GluR2 without ADAR2 activity. Thus, ADAR2 specifically edits the GluR2 Q/R site and loss of ADAR2 activity causes death of motor neurons by failure to edit the GluR2 Q/R site but not other ADAR2-mediated editing positions. Because of the similarity to the ALS pathogenesis, AR2 mice provides a tool for ALS research and therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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、神経細胞死、AMPA受容体、GluR2、RNA editing

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、働き盛りの壮年層を侵し、数年のうちに死に至らしめる、有効な治療法のない原因未解明の神経難病である。有病率は人口10万対2-8であるが、発症率は2-3/年前後であり、年齢と共に上がるので65歳以降ではこの10倍以上に上るといふ研究もある。社会的な損失も大きい。そのため、病因の解明、治療法の開発が望まれている。ALSの90%以上は孤発例で、家族発症のALSに見出されている幾つかの遺伝子異常はその大多数には認められていない(1)。したがって、遺伝子異常によるALSの表現型を持つ疾患は、ALSの大多数を占める孤発性ALSの病因を説明せず、発症には異なる病因メカニズムが働いていると考えられている。実際、家族性ALSの20%（全ALSの1%）を占めるとされるSOD1関連家族性ALS患者に見出される分子異常と孤発性ALS患者のそれとの間には大きな相違があることが知られている(2-5)。したがって、ALSの病因解明には孤発性ALSに特化した分子異常の解明が必須であるが、本質的な分子異常を特定することは必ずしも容易ではない。

われわれは、孤発性ALS患者の剖検組織の解析から、下記に述べる分子異常を見出し、その疾患特異性、部位選択性、他の疾患特異

的分子異常との分子関連、神経細胞死との関連について検討を加え、孤発性ALSの病因に深く関わることを明らかにしてきた(5-8)。その中で、これまでに孤発性ALSに見出された分子異常の中でも最も疾患特異性が高く、かつ神経細胞死に関与する分子異常であることが明らかになった。近年GluR2のRNA編集異常の他にも、TDP-43タンパクの核からの喪失および細胞質封入体の形成が、孤発性ALS運動ニューロンに特異性の高い分子異常として見出された(9, 10)。免疫組織化学的検討により、このTDP-43病理とGluR2のRNA編集異常とが同一の運動ニューロンに共存することが明らかになり(11)、両者の間には分子関連があることが示された。このように、疾患特異性が高く、しかも神経細胞死と密接に関連する二つの分子異常が変性する運動ニューロンに見出されていることは、GluR2のRNA編集異常が孤発性ALS運動ニューロンの細胞死に深く関与していることを支持する所見であり、ALSの病因に果たす役割を解析することは疾患の理解、治療法の開発に大いに役立つと考えられ、本研究では、ALSの分子病態を再現するモデル動物の開発・解析を行った。

孤発性ALSの患者剖検脊髄の解析から、

運動ニューロンでは、グルタミン酸受容体のサブタイプである AMPA 受容体の GluR2 サブユニットに本来生ずべき RNA 編集がおこらず、未編集型 GluR2 mRNA が相当量発現していることを見出した(6, 8)。この RNA 編集は、pre-mRNA のアデノシン (A) をイノシン (I) へ置換する反応) A-to-I 変換) であり、GluR2 pre-mRNA のグルタミン・アルギニン(Q/R) 部位が CAG から CIG に変換される。翻訳時に I はグアノシン (G) として認識される結果 Q/R 部位は遺伝子にコードされたグルタミン (Q) ではなくアルギニン (R) にアミノ酸置換された GluR2 タンパクが発現する。

この分子変化はAMPA受容体のイオン透過性特性を大きく変える。すなわち、AMPA受容体は4個のサブユニットからなる四量体であり、興奮性神経伝達に中心的な役割を持っている。ニューロンに発現するAMPA受容体の大多数はGluR2 を含み、全てのGluR2 のQ/R 部位は編集されたR型のため、Ca²⁺透過性が低い。生理的には発現しないQ/R 部位が未編集 (Q型) のGluR2 が発現すると、大多数のAMPA受容体はQ型GluR2 を含むことになりAMPA受容体はCa²⁺透過性が高くなる。さらに、Q型GluR2 はR型GluR2 に比べ、樹状突起のスパインへの輸送効率が高いため、少量のQ型GluR2 が発現しただけでもニューロンに発現する機能的なAMPA受容体のCa²⁺透過性を総体として亢進させると予想される。パッチクランプによる電気生理学的な研究からもこの部位のアミノ酸がAMPA受容体のCa²⁺透過性に大きく影響することが明らかにされている。さらに、生物学的にも重要な役割を果たしていることは、Q型GluR2 のみを発現する変異マウスはけいれん重積により幼弱死することから明らかである(12)。

2. 研究の目的

このような知見から、孤発性 ALS 患者運動ニューロンに見出されたQ型GluR2 の発現が神経細胞死に極めて密接に関連する分子異常であることが予想されたが、その直接的な証明は得られていなかった。神経細胞死に関与することを示唆する知見として得られているものは、人工的にQ/R 部位をアスパラギン (N) に置換した GluR-B (N) ミニ遺伝子のトランスジェニックマウスで、脊髄の前角ニューロン数が減少し運動ニューロン疾患様の表現型を呈した(13) 報告のみであった。この変異マウスから得られた結果は興味深いものがあるが、人工的な遺伝子のトランスジェニック動物である点、発現量や発現部位などの二次的な影響を否定できず、また病変部位が多岐に及ぶ、など、ALS における神経細胞死と直接な関連性を論ずるには多くの問題があった。本研究では、孤発性 ALS 運動ニューロンに見出された GluR2 の RNA 編集異常を再現する動物モデルの解析により、運動ニューロン死を引き起こすかどうか、ALS の表現型を再現するかどうか、その分子メカニズムは何か、の検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

GluR2 Q/R 部位のRNA編集は、二重鎖RNAに作用するadenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2) により特異的に触媒される。しかも、ADAR2 活性を規定する因子の一つであるADAR2 mRNAの発現量(14)は孤発性ALSの前角組織で減少している(15)、孤発性ALS運動ニューロンではADAR2 活性が低下していることが予想される(7)。そのためにはADAR2 をノックアウトすることが近道であるが、全身的ADAR2 ノックアウトマウスは、GluR2 Q/R 部位のRNA編集を欠損する変異マウス同様、けいれん重積

により幼弱死してしまう(16)ため、運動ニューロン死が生ずるかどうかを明らかにすることができない。この、非特異的なけいれん死を避けるため、運動ニューロンに選択的なADAR2 コンディショナルノックアウトマウスを開発した(17)。ADAR2 遺伝子の活性基ドメインを2個のLoxPで挟んだ変異アリルをホモに持つADAR2^{flox/flox}マウスを作成し、運動ニューロン選択的にCre recombinaseを発現する変異マウスVAcHT-Creマウスとの交配により、ADAR2^{flox/flox}/VAcHT-Creマウス(AR2マウス)を作成した。AR2マウスの行動変化、神経筋単位の病理学的変化、脳神経核・脊髄の運動ニューロン数の変化を経時的に解析した。また、ADAR2を欠損した運動ニューロンにおけるGluR2 Q/R部位のRNA編集率を測定した。

GluR2 Q/R 部位以外のRNA編集部位がどう関与するかを検討するためにAR2マウスをGluR-B(R)マウスと交配し、AR2resを作成した。GluR-B(R)マウスは内因性GluR2遺伝子を、Q/R部位がCGGであるGluR-B^R遺伝子と置換し、内因性に編集型GluR2を発現するマウスである。したがって、AR2res(AR2/GluR-B^R)マウスはADAR2活性無しにR型GluR2のみを発現するので、細胞死に陥ったADAR2を欠損した運動ニューロンが、GluR2 Q/R部位の編集が出来ないためか、それ以外のADAR2により編集される部位のRNA編集異常によるのかを明らかにすることが出来る。AR2resマウスの行動変化、ADAR2を欠損した運動ニューロンの脱落の有無を解析した。

4. 研究成果

AR2マウスでは約半数の脊髄運動ニューロンでCreが発現し、それに伴いADAR2遺伝子にrecombinationが起こっていた。ADAR2の免疫組織化学での検討でも、コントロールマウス

(野生型、ADAR2^{flox/flox}マウス、VAcHT-Creマウス)の何れにおいても、全ての運動ニューロンの核がADAR2免疫活性を持っていたのに対し、AR2マウスではADAR2免疫活性を欠く運動ニューロンが出現していた。AR2マウス脊髄ではGluR2 Q/R部位RNA編集効率が低下しており、単一運動ニューロンでの検討から、ADAR2を欠失した運動ニューロンはQ型GluR2のみを発現していることが明らかになった(図1)。

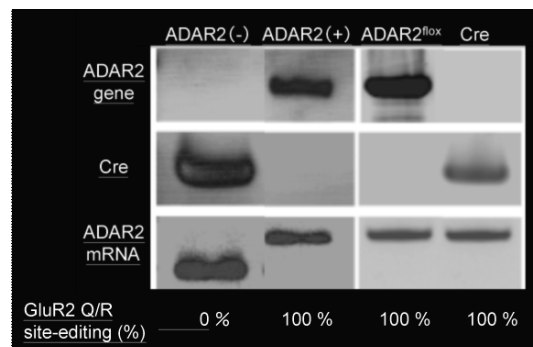


図1: AR2マウスのCre依存性にADAR2を欠失した運動ニューロン(ADAR2(-))の発現するGluR2は全て未編集型だが、ADAR2を発現する運動ニューロン(ADAR2(+))は対照マウス(ADAR2^{flox}, Cre)同様全て編集型であった。

この変異マウスは、Creの発現時期以降に進行性の運動機能低下を示し、6ヵ月齢前後でロータロッドスコアが底値を示した。その後も生存したが、1.5歳前後で死亡した(図2)。

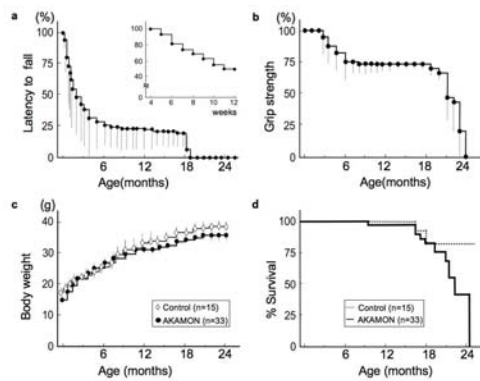


図2：ロータロッド (a)、前肢握力 (b) は AR2 マウスの対照マウスに対する比率で表した。

運動ニューロン数の算定から、ADAR2 の欠失は約半数の運動ニューロンに生じており、その半数が2ヵ月齢までに脱落し、残りの半数も指数関数的に脱落し ($N = Ae^{-t} + B$)、12ヵ月齢で数%に減少した。これに対しADAR2 を発現する残り半数の運動ニューロンには脱落は見られなかった。運動ニューロンの変性脱落に伴う脊髄のグリア細胞の増勢、前根軸索の変性脱落、神経筋接合部での除神経・再支配、電気生理学的な Fibrillation, fasciculation が認められた (図3)。

脊髄運動ニューロン以外の運動ニューロンでの検討では、三叉神経運動核、顔面神経核、舌下神経核では GluR2 Q/R 部位 RNA 編集効率は90%前後に低下しており (コントロールでは100%)、大径ニューロンの脱落を認めたが、動眼神経核、滑車神経核、外転神経核では GluR2 Q/R 部位 RNA 編集効率低下が同程度に生じていながら、ニューロン数に変化がなかった。この結果は外眼筋を支配する運動ニューロンはADAR2 活性低下により引き起こされる神経細胞死のメカニズムに対して抵抗性が高いことを示しており、ALS では眼球運動が保たれるという臨床的観察に合致してい

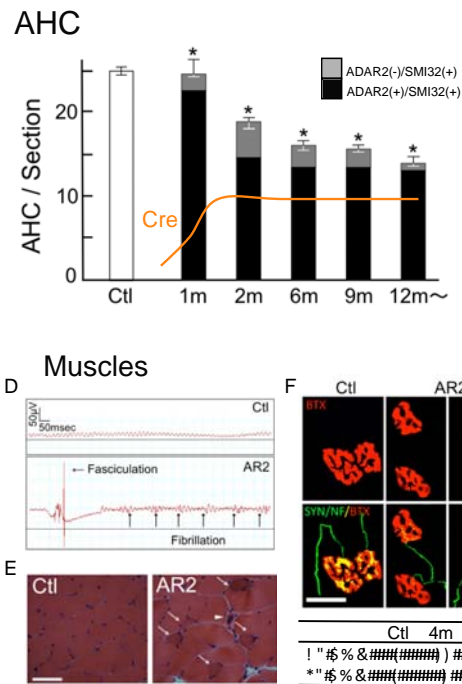


図3：AR2 の月齢ごとの前角細胞数 (AHC) .ADAR2 欠損ニューロンはCre の発現がピークに達する5週齢以降減少しているがADAR2 を発現するニューロン数は変化しない。筋電図 (D) ,筋組織 (E) ,神経筋接合部 (F) .脱神経所見 (De NMJ)、再神経支配所見 (Re NMJ) の頻度を示す。

る。この差を生じるメカニズムとしては、 Ca^{2+} バufferタンパクである parvalbumin の発現が脊髄運動ニューロンでは少なく、外眼筋運動ニューロンでは多いという観察結果、parvalbumin の過剰発現により興奮性神経細胞死が抑制されるという動物実験の結果から、 Ca^{2+} バufferシステムの違いに依ることが想定される。

上記の結果から、ADAR2 活性欠損は選択的運動ニューロン死の直接原因であることが示されるが、ADAR2 が触媒するRNA編集はGluR2 Q/R 部位以外にも多数存在することから、GluR2 Q/R 部位以外のRNA編集部位

がどう関与するかを検討する必要がある。このことを確かめるためにAR2 マウスをGluR-B(R) マウスと交配し、AR2/GluR-B^{R/R} (AR2res) マウスを作成した。AR2 マウスでADAR2 を欠失した運動ニューロンの2/3 が脱落する6ヵ月齢での検討で、AR2resマウスの運動機能はコントロールと変わらないこと、運動ニューロン数は保たれていること、そのうちADAR2 免疫活性を持たない運動ニューロンが30%程度認められること、脊髄前角におけるグリア細胞の増勢も全くみられないこと、が明らかになり、ADAR2 活性低下が引き起こす運動ニューロン死は専らGluR2 Q/R 部位のRNA編集異常により、それ以外のADAR2 よりRNA編集を受ける部位の関与がないことが証明された。

以上の解析から、孤発性ALS 運動ニューロンにおける未編集型 GluR2 の発現は病因的意義を持っていること、AR2 マウスがこの分子病態を再現するモデルであることが明らかになり、ALS の病因研究、治療法開発研究にとり有用なツールとなることが示された。

(引用文献)

1. Schymick JC, *et al*, *Hum Mol Genet* **16 Spec No. 2**: R233-242, 2007. 2. Kawahara Y, *et al*, *Neurosci Res* **54**: 11-14, 2006. 3. Mackenzie IR, *et al*, *Ann Neurol* **61**: 427-434, 2007. 4. Tan CF, *et al*, *Acta Neuropathol (Berl)* **113**: 535-542, 2007. 5. Kwak S, *et al*, *Neuropathology* **30**: 182-188, 2010. 6. Kawahara Y, *et al*, *Nature* **427**: 801, 2004. 7. Kwak S, *et al*, *J Mol Med* **83**: 110-120, 2005. 8. Takuma H, *et al*, *Ann Neurol* **46**: 806-815, 1999. 9. Arai T, *et al*, *Biochem biophys res comm* **351**: 602-611, 2006. 10. Neumann M, *et al*, *Science* **314**: 130-133, 2006. 11. Aizawa H, *et al*, *Acta Neuropathol* **120**: 75-84, 2010. 12. Brusa R, *et al*,

Science **270**: 1677-1680, 1995. 13. Kuner R, *et al*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5826-5831, 2005. 14. Kawahara Y, *et al*, *Eur J Neurosci* **18**: 23-33, 2003. 15. Kawahara Y, *et al*, *ALS* **6**: 131-144, 2005. 16. Higuchi M, *et al*, *Nature* **406**: 78-81, 2000.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 23 件 内査読あり: 14 件)

① Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S: Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci* **30**:11917-11925, 2010. (査読あり)

② Kwak S, Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H: AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS. *Neuropathology* **30**:182-188, 2010. (査読あり)

[学会発表] (計 61 件)

① 郭 伸: シンポジウム「神経変性疾患の分子標的治療への新たな展開」, 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋, September 13-18, 2009.

[図書] (計 4 件)

[その他] (計 10 件)

[産業財産権] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郭 伸 (KWAK SHIN)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 40160981