

筋萎縮性側索硬化症の病因解明に突破口

東京大学大学院 医学系研究科 神経内科学の郭 伸 助教授、河原 行郎 大学院生らの研究グループは、神経難病である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) [#1] の病因につながる神経細胞死のメカニズムを世界に先駆けて解明しました。

ALS は、19世紀後半にフランスの神経学者シャルコーらにより報告されて以来、多くの研究者による病態解明の努力にもかかわらず病因が未だ解明されていない、運動ニューロンが変性脱落していく神経難病です。本研究において、ALS 脊髄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 RNA 編集 [#4] が不十分にしか行われていないことが初めて明らかになりました。RNA 編集が不十分だとニューロンは死んでしまい、神経細胞の生存にとってきわめて重要な反応です。正常ニューロンは勿論、ALS の運動ニューロン以外のニューロンや、ALS 以外の神経疾患で変性しているニューロンでも RNA 編集は正常であることから、グルタミン酸受容体の RNA 編集の欠陥は ALS で運動ニューロンだけが変性していく原因に密接に関連したものであると考えられます。この欠陥を正常化するための治療戦略を組むことで、ALS を治療に導く治療法の開発が期待できます。この発見は、従来全く糸口さえつかめなかった ALS の病因に迫るものであると共に、家族性 (遺伝性) ALS ではなく、ALS の大多数を占める孤発性 (非遺伝性) ALS を対象とした点にも特徴があります。

本研究成果は、英国の学術雑誌 Nature 2月26日号¹に掲載されます。なお、本研究は、文部科学省科学研究費、厚生労働省科学研究費補助金、米国 ALS 協会 Research Grant、公益信託「生命の彩」ALS 研究助成基金より研究助成を受けています。

{問い合わせ先}

東京大学医学部附属病院神経内科 助教授 郭 伸
 電話：03-3815-5411 内線 33783, 03-5800-8672
 FAX：03-5800-6548

¹ Embargo は日本時間 2月26日 (木) 午前3時ですのでご承知置きください。

【背景】

筋萎縮性側索硬化症²ALS [#1] は、英国の天文物理学者ホーキング博士や米国大リーガーのルー・ゲーリック選手が罹患した疾患としても知られており、運動ニューロンの細胞死に特徴づけられ、19世紀後半にフランスの神経学者シャルコーらにより疾患概念として提唱されて以来130年余が経過した現在でも、ニューロン死のメカニズムについては全く分かっていません。家族性ALSの2疾患では遺伝子異常が同定されていますが(ALS1におけるSOD1遺伝子、ALS2におけるALS2遺伝子)、なぜ運動ニューロンが死ぬのかというメカニズムは依然として謎です。遺伝性の明らかでない、孤発性ALSについては様々な病因仮説が立てられていますが、最も有力なものは興奮性神経細胞死[#2] (図1) 仮説です。しかし、これまで確固たる科学的根拠は得られませんでした。

興奮性神経細胞死に主役を演ずるのは、グルタミン酸受容体であり、中でもAMPA受容体[#3]と呼ばれるサブタイプです。AMPA受容体を持続的に刺激すると、遅発性の神経細胞死(緩徐な細胞死)がおり、これには、AMPA受容体を通るカルシウムイオン(Ca²⁺)の増加が引き金になることが分かっています。したがって、AMPA受容体にCa²⁺をより多く通すような変化が起これば神経細胞死を引き起こしやすくなるわけです。AMPA受容体のCa²⁺の透過性を規定するのはGluR2サブユニットであり、GluR2をサブユニットに含むAMPA受容体はCa²⁺透過性が低いが、GluR2を含まないAMPA受容体は高いCa²⁺透過性を持ちます(図2)。ただし、このGluR2は、RNA編集[#4]を受けて初めてCa²⁺透過性を規定することができ、未編集のGluR2を含んでいてもそのAMPA受容体のCa²⁺透過性は高いままです(図2中)。しかも、GluR2のノックアウトマウスは致死性でないのに、GluR2のRNA編集を人工的に阻止した変異マウスは生後20日にけいれんが止まらず死んでしまうので、RNA編集に欠陥があることは神経細胞にとり生存を危うくする異常なのです。

運動ニューロンはAMPA受容体が関与した興奮性神経細胞死のメカニズムに脆弱であることが知られています。従って、ALSのような運動ニューロンが変性する神経疾患で、AMPA受容体を介した興奮性神経細胞死を引き起こす、GluR2のメッセンジャーRNA(mRNA)に編集異常が起こっているかどうかは、病因との関連で明らかにすべき課題でありました。

【研究手法】

私どもは、GluR2の量的な減少がALSの脊髄運動ニューロンでは生じていないこと、組織レベルではGluR2のRNA編集がALS脊髄前角(運動ニューロンが局在する部位)で低下していることをすでに報告しております(本論文の引用文献4,5)。したがって、ニューロン死との関連を調べるには、個々のニュー

² 新聞用語にしばしばみられる「萎縮」の文字は、意味が全く違いませんので、絶対に使わないでください。

が ALS 以外の原因で細胞死に陥っているニューロンには必ずしも生じていないものであることを意味します。実際、様々な細胞死を引き起こす実験条件によっても GluR2 mRNA の編集率は 100% に保たれることが動物実験で報告されています。

〔この研究の意義・将来への展望〕

1. 神経難病の研究は、単因子遺伝疾患の責任遺伝子同定に関する研究において過去 10 数年で長足の進歩を遂げましたが、発症のメカニズムは未解明のものが大多数を占めます。遺伝性 ALS の場合も、SOD1 遺伝子の点突然変異によることが明らかにされてから (1993) 10 年以上が経ちますが、細胞死と SOD 活性との間に相関がなく、細胞死のメカニズムは依然謎です。
2. 遺伝の明らかでない孤発性 (または多因子遺伝) 疾患は、神経難病の大部分を占めるにもかかわらず、遺伝性疾患の責任遺伝子同定に用いられた研究手法が通用しないこと、病因と関連する標的の分子を絞りきれないこともあり、さらに研究が遅れておりました。
3. RNA 編集は、機能分子に遺伝子には表されない修飾を行うもので、遺伝子変異では説明のできない疾患、病態を説明する上で、RNA 編集の異常が孤発性疾患の病因に関与している可能性は十分に想定しうるものです。本研究で神経細胞死に関与している最初の例が示されたことは、今後の神経難病研究の方向性を示唆している可能性があります。
4. グルタミン酸受容体のような、中枢神経の神経活動に中心的な機能を持つ分子の異常が細胞死に結びつき、さらにそれが疾患特異的に現れている事を明らかにした例はきわめて少なく、本研究は希少な例です。
5. 病因が機能分子の異常であることが明らかになり、その機能を正常化することにより、治療を目指した根本治療の開発につながると期待されます。

〔謝辞〕

基礎医学研究の必要性にご理解を示され、研究材料にご遺体を快くご提供くださいました患者様、ご遺族に感謝申し上げます。共同研究者以外にも、多くの病理医、臨床医など医療スタッフの協力を得ましたことに感謝します。

ロンで GluR2 mRNA の編集が正常に行われているかどうかを調べる必要があります。そのために、

1. 単一のニューロン組織を採取するために、教室で作成したエキシマレーザー光を用いたマイクロディセクターを使用しました (図 3a)。
2. 得られた微小な単一ニューロン組織から、逆転写ポリメラーゼ鎖反応 (RT-PCR) 法により、GluR2 mRNA 由来の cDNA を増幅するシステムを確立しました (図 3b)。
3. GluR2 mRNA の編集率を算出するために、RT-PCR 産物を、編集部位を認識する制限酵素で切断し、電気泳動のパターンから切断断片を定量しました (図 3c)。

この手法により初めて単一ニューロン組織における GluR2 mRNA の編集率を算出することができるようになったのです。この変化が、ALS の脊髄運動ニューロンだけで起こっている異常なのかどうかを考察するために、正常ニューロンでの検討のみならず、ALS 以外の神経疾患脳の変性したニューロン、ALS の脊髄運動ニューロン以外のニューロンとして小脳プルキンエ細胞での検討を加えました。

[研究成果]

実験の結果、以下のことが分かりました (図 4)。

1. 5例の ALS の脊髄運動ニューロン (総数 78) で調べたところ、GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率はニューロンにより 0% から 100% までばらついていました (平均 38.1% - 75.3%)。これに対し、5例の正常対照脊髄運動ニューロン (総数 76) では全例で 100% でした。
2. 小脳プルキンエ細胞は、ALS、脊髄小脳変性症、正常対照とも、ほぼ 100% でした (平均 98.8% - 99.9%)。

すなわち、ALS の脊髄運動ニューロンでは、未編集の GluR2 mRNA が発現していること、編集率は細胞により異なり、低下しているものと低下していないものがほぼ半数ずつ混在していることが分かりました。遺伝子導入マウスによる検討では、未編集 GluR2 mRNA が 20-30% に達すると緩徐な脊髄運動ニューロン死が起こるといいます。したがって、ここで得られた結果は、脊髄運動ニューロンの神経細胞死を引き起こすに十分な分子変化であると考えられます。

ALS の小脳では RNA 編集が正常に行われていた結果は、ALS の全てのニューロンに RNA 編集の欠陥があるわけではないことを示しています。また、脊髄小脳変性症で RNA 編集率が落ちていなかったことは、死にかけているニューロンでも RNA 編集が正常に行われていることを示しており、この分子変化

[補足説明]

#1) 筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)

ALS は、1869 年、フランスの神経学者 Charcot & Joffroy により最初の症例が報告され、1874 年に疾患概念として Charcot により提唱された、全身の骨格筋を支配する運動ニューロンを選択的かつ系統的に障害し、運動神経の変性脱落により呼吸筋を含むほぼ全身の筋萎縮を来す進行性の神経難病です。ALS の患者数は世界的に 10 万人あたり 2~8 人で、日本全国に 5~6 千人の患者がおられると推定されています。身体的な障害が重い上に、末期まで意識、知能が保たれることもあり、精神的な負荷も大きく、また、介護に当たる家族も長期にわたり他に類を見ない物心面での負担を強いることから、病因の解明、特異的治療法の開発は、社会的、人道的にも急務であります。一部 (5-10%) は、家族性の発症がみられ遺伝性ですが、大部分は遺伝の関与はない孤発性の疾患であると考えられています。

#2) 興奮性神経細胞死 (図 1)

神経伝達は興奮性と抑制性の 2 種類があり、中枢神経の興奮性神経伝達はシナプスにおける神経伝達物質であるグルタミン酸が行っています。すなわち、前シナプスから放出されたグルタミン酸が後シナプスのグルタミン酸受容体に結合し、この受容体を通過するイオンが増減して神経細胞膜の電位が変化 (脱分極) することにより行われるわけです。そこには、神経興奮が過不足無く行われるような様々な調節機構があり、ニューロンを細胞死から保護しています。その調節機構に障害があると、神経が興奮しすぎて死に至るわけで、これを興奮性神経細胞死と総称しています。

#3) AMPA 受容体 (図 2、5 b)

グルタミン酸受容体にはいくつかの種類があり、イオンを通す受容体の中に AMPA 受容体があります。AMPA 受容体はサブユニット構造をとっており、4 種のサブユニット (GluR1~GluR4) からの組み合わせによる 4 量体と考えられています。AMPA 受容体は主にナトリウムイオンを通すことにより膜電位を調節しますが、一部にカルシウムイオン (Ca^{2+}) をよく通すものがあります。AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を規定するのは GluR2 サブユニットであり、GluR2 をサブユニットに含む AMPA 受容体は Ca^{2+} 透過性が低いが、GluR2 を含まない AMPA 受容体は高い Ca^{2+} 透過性を持ちます。ただし、この GluR2 は、RNA 編集 [#4] を受けて初めて Ca^{2+} 透過性を規定することができ、未編集の GluR2 を含んでいてもその AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性は高いままです。脊髄運動ニューロンは、AMPA 受容体の密度が高いことが明らかにされています。

#4) RNA 編集 (図5)

生物を構成する様々なタンパク質の構造は遺伝子に書かれており、その遺伝子の DNA 情報が正確にメッセンジャー-RNA に転写され、さらに蛋白に翻訳される、というのがセントラルドグマです。蛋白に伝わるべき、遺伝子 (DNA) にコードされた塩基情報が、mRNA に転写された段階で書き換えられることがあります。これはランダムに起こるのではなく、4種の核糖のうちアデノシン (A) からイノシン (I) へ、およびシトシン (C) からウラシル (U) への書き換えのみが知られています (図5a)。

AMPA 受容体の場合、GluR2 の第2膜ドメインの一塩基が前者の反応で編集され、この結果アミノ酸レベルでは編集前のグルタミン (Q) が編集後にアルギニン (R) になり (そのためこの場所を Q/R 部位と呼びます) (図5b)、このアミノ酸置換が AMPA 受容体のイオン透過性を変え、未編集の Q の場合は Ca^{2+} 透過性ですが編集された R の場合は Ca^{2+} 非透過性になります。哺乳類でもヒトでも、脳の GluR2 は Q/R 部位での編集率が胎児から大人まで 100% に保たれています。これを人工的に起こらなくした変異動物は神経細胞が興奮性細胞死を起こし、死んでしまいます。また、神経細胞死を起こすような過酷な条件下でも RNA 編集が落ちるといふ報告はなく、さわめて高度に保存されています。さらに、ALS との関連では、未編集型と同様の機能を持つ人工的な GluR2 遺伝子を遺伝子導入したマウスでは、生後1年ほどで ALS 様の症状を出すことが報告されています。

図1：興奮性シナプスと神経細胞死。A：通常のグルタミン酸作動性シナプス。グルタミン酸 (Glu) 俄然シナプスから放出され、後シナプス側の受容体(iGluR, mGluR)を興奮させる。余剰のグルタミン酸はトランスポーター (GluT) により細胞内に取り込まれる (太い矢印)。iGluR からは Ca^{2+} が細胞内に流入する。B：神経細胞死に先立つ後シナプス側細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を示す。AMPA 受容体 (青) からの Ca^{2+} 流入増加を示す。シナプス間隙のグルタミン酸濃度上昇によっても AMPA 受容体の性質の変化によっても Ca^{2+} 流入は増加する。

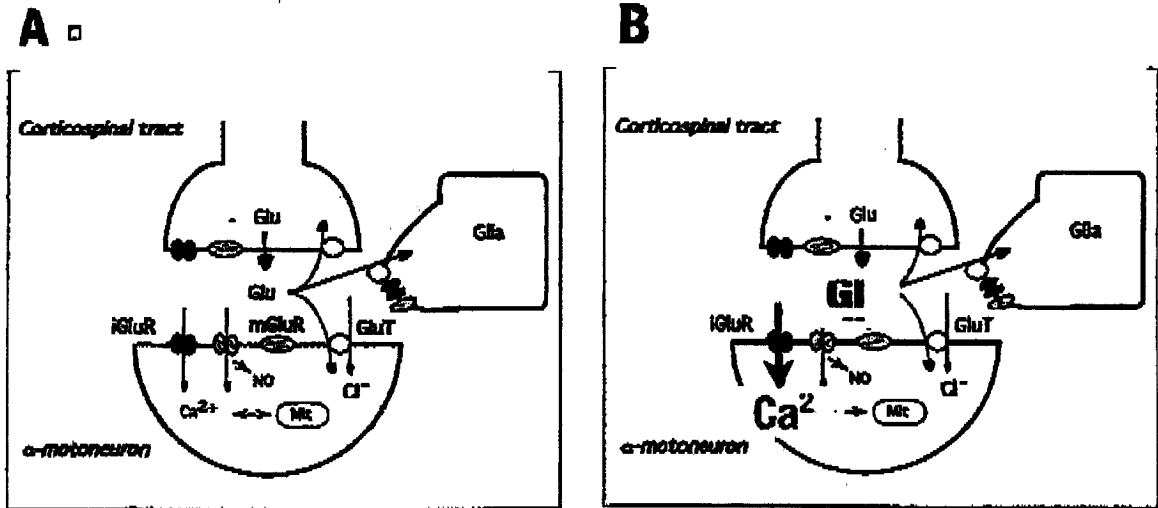


図2 AMPA 受容体と GluR2 サブユニット

AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性と GluR2 サブユニット。AMPA 受容体はサブユニット GluR1~GluR4 による 4 量体。編集型 GluR2 (赤) がサブユニットに入っていると Ca^{2+} 非透過性だが (左)、入っていない AMPA 受容体は透過性である (右)。未編集型 GluR2 (桃色) が入っていてもやはり Ca^{2+} 透過性になる (中)。未編集 GluR2 を含む AMPA 受容体は細胞死に関与するが、GluR2 を含まない AMPA 受容体の関与は低い。

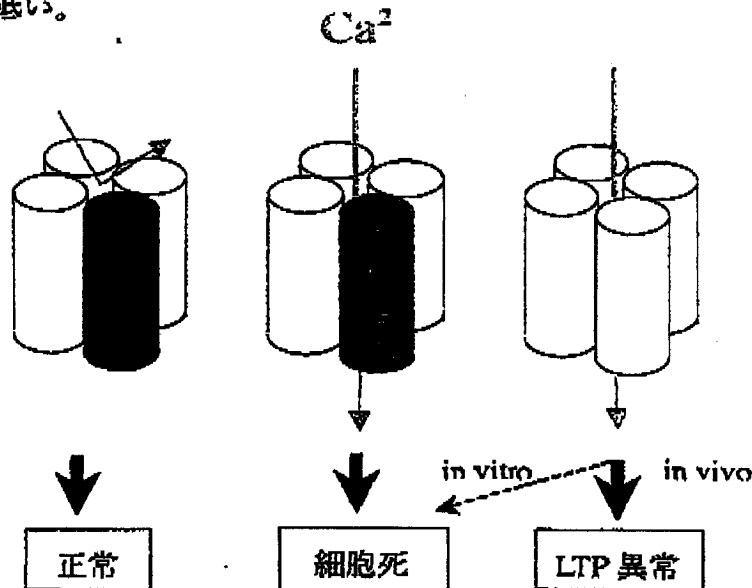
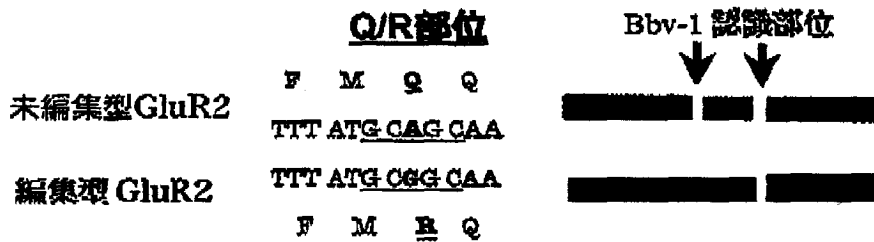


図3：方法

A：レーザーマイクロディセクターでの単一運動ニューロンの切り出し。切り出し前（左）、輪郭に沿った切除（中）、組織を採取した後（右）。



B：RT-PCR産物の核酸配列と、制限酵素Bbv-1で認識される部位。未編集型GluR2は2カ所、編集型GluR2は1カ所で切断される。Aで採取した単一ニューロン組織のRT-PCR産物をBbv-1で切断することにより、未編集型GluR2 mRNAと編集型GluR2 mRNAの割合が定域できる。



C：実際にPCR産物をBbv-1で消化し、電気泳動で定量した結果。全てが編集GluR2 mRNA由来の場合断片は2本（66bp, 116bp）（左）、全てが未編集GluR2 mRNA由来の場合、断片は3本（35bp, 66bp, 81bp）（右）、両者が混在している場合、ピークを定量することにより、編集GluR2 mRNA由来の割合（編集率）を算定することができる。

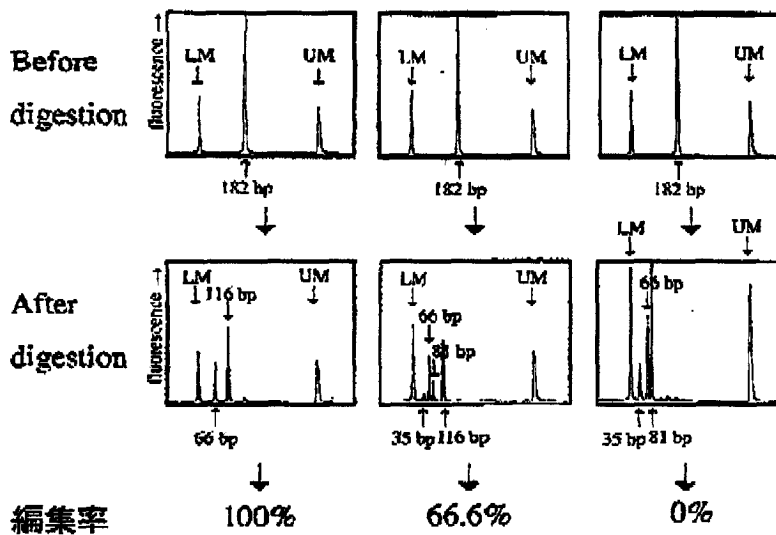


図4：単一ニューロンでの GluR2 mRNA Q/R 部位の編集率 (本論文の Fig.1)

筋萎縮性側索硬化症の運動ニューロンでのみ RNA 編集が落ちている。A1~A5：筋萎縮性側索硬化症、C1~C5：正常対照、D1,D2：歯状核赤核レイ体萎縮症（脊髄小脳変性症）

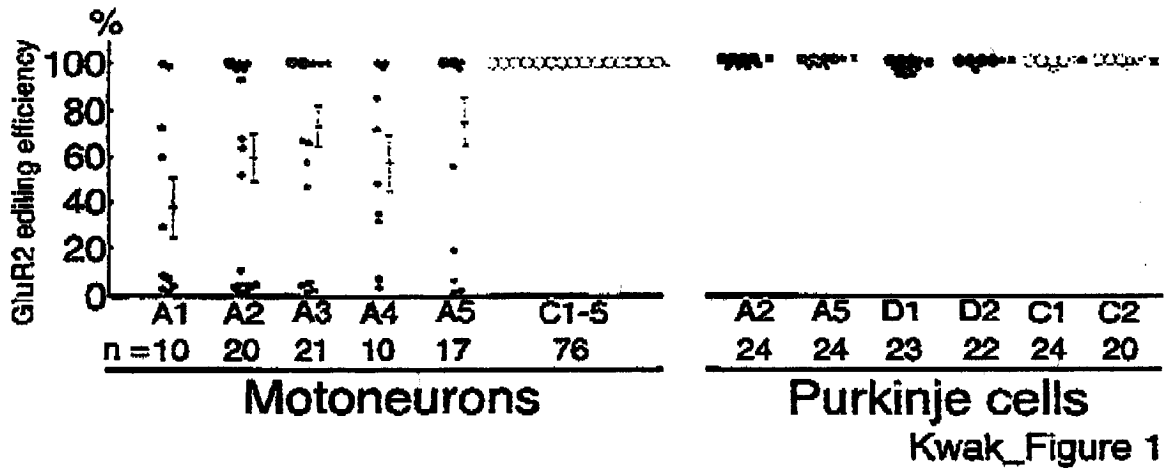


図5：RNA 編集
A:RNA 編集とは

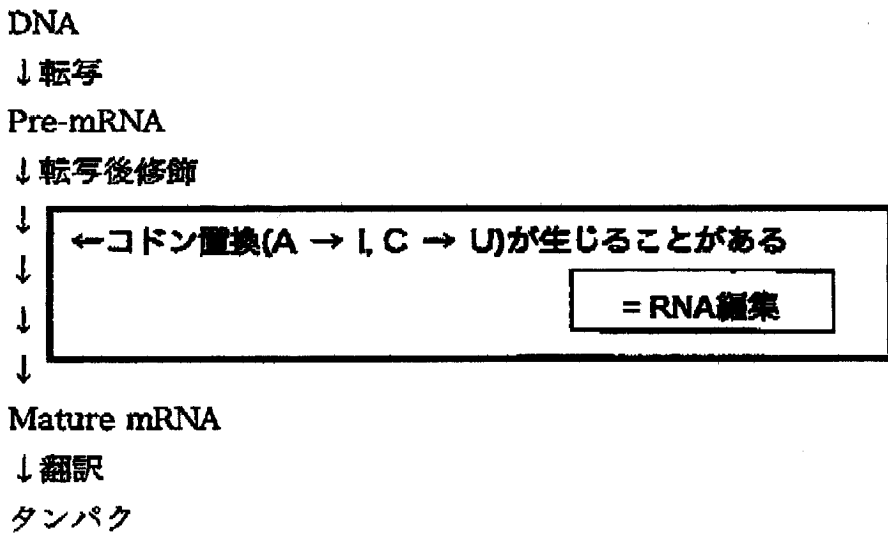


図5 B : GluR2 の構造。

Q/R 部位は第二膜ドメイン (M2) に局在している

