

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	澤田 潤
-------	-----	-----	------

学 位 論 文 題 目

抗うつ薬のグルタミン酸受容体サブユニットGluR2のRNA編集率に与える影響に関する研究
 - 筋萎縮性側索硬化症の治療薬としての可能性について -

共著者名 ; 相澤 仁志、山下 雄也、油川 陽子、長谷部 直幸、郭 伸

印刷公表の方法及び時期 未公表

研究目的

孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の脊髄運動ニューロンでは、グルタミン酸受容体(GluR)のうちAMPA受容体のサブユニットであるGluR2のグルタミン(Q)/アルギニン(R)部位のRNA編集率が疾患特異的・部位選択的に低下していることが報告された。AMPA受容体は4つのサブユニットからなる4量体で、その構成サブユニットに少なくとも1つの編集型GluR2が存在しなければ、Ca²⁺流入が上昇し、細胞死に至ることが知られている。これらの事実から、GluR2 Q/R部位のRNA編集率の低下がALSの運動ニューロン死の病態に深く関与していると考えられる。GluR2 Q/R部位のRNA編集は主に、adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2)によって行なわれ、ADAR2活性を上昇させる薬剤はALSの運動ニューロン死を阻止しうる可能性があると考えられる。現在まで、抗うつ薬がGluRサブユニットの遺伝子発現量及びRNA編集率を変化させることが報告されている。そこで、GluR2 Q/R部位の編集率測定系を確立し、抗うつ薬の同部位のRNA編集率及びRNA編集に関わる遺伝子発現への影響を検討し、ALS治療薬となりうる薬剤をスクリーニングすることを目的とした。

材料・方法

1. 材料

ヒト神経芽細胞腫由来であるSH-SY5Y細胞と、HeLa細胞(Tet-on HeLa細胞)の2種類の培養細胞を使用した。Tet-on HeLa細胞は、スプライシングが行なわれる前のGluR2 Q/R部位のみを含むミニ遺伝子(preGluR2)をTet-on Gene Expression Systemを用いて導入し、人為的に同部位のRNA編集率を低下させたものである。検討した抗うつ剤は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)のfluvoxamine・fluoxetine・paroxetineの3種、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(SNRI)では milnacipran・reboxetineの2種、三環系抗うつ薬としてamitriptyline・desipramine・imipramineの3種である。

2. 方法

1) 細胞の培養及び薬剤負荷

SH-SY5Y細胞では、培地はMEM/F12に10%牛胎児血清(FCS)、100IU/mlペニシリン(PC)及び100 μ g/mlストレプトマイシン(SM)を添加したものをを用いた。Tet-on HeLa細胞では、MEM- α に10% Tet-system approved FBS、100IU/ml PC及び100 μ g/ml SM、0.75 μ g/ml puromycinを添加したものをを用いた。それぞれの細胞を、ディッシュ内で集密になった状態で各薬剤を10 μ M以下の濃度で24時間負荷した。

2) GluR2 RNA編集率の測定

薬剤負荷後、培養細胞からtotal RNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを作製した。Nested PCR法を用いてcDNAのGluR2 Q/R部位を含む領域を増幅させた後、DNA精製を行い、制限酵素(Bbv I)による酵素処理を行なった。未編集型のGluR2が存在する場合、編集型GluR2では出現しない切断フラグメントが出現することを利用し、2100 Bioanalyzerを用いてその比を測定し、同部位のRNA編集率を算出した。

3) mRNA発現量の測定

GluR2編集率の有意な上昇を認めた薬剤を負荷したサンプルに関して、LightCycler Systemを用いたReal-Time PCR法によって、基質に対する酵素の相対発現量比として、SH-SY5Y細胞ではADAR2/GluR2比を、Tet-on HeLa細胞ではADAR2/preGluR2比を測定した。

3. 統計解析

すべてのデータは平均±標準誤差で表示した。P<0.05をもって統計学的に有意と判定した。

成績

1. GluR2編集率変化

SH-SY5Y細胞では、fluvoxamine、fluoxetine、amitriptylineの10 μ M以下の濃度でcontrolに対して有意なGluR2編集率の上昇を認め、そのうち、10 μ Mのfluoxetineでcontrol比123.5%の最大上昇率を認めた(P<0.001)。

Tet-on HeLa細胞では、10 μ M以下の paroxetine、fluvoxamine、milnacipran、amitriptyline、desipramine、imipramineでcontrolに対し有意なGluR2編集率の上昇を認め、そのうち、10 μ Mのimipramineでcontrol比142.8%の最大上昇率を認めた(P<0.001)。

2. mRNA発現量定量

SH-SY5Y細胞では、amitriptylineの一部の濃度で、ADAR2のGluR2に対するmRNA相対発現量比の有意な低下が認められたが、GluR2 Q/R部位の編集率との明らかな相関は認められなかった。GluR2 mRNA及びADAR2 mRNAに関しては、いずれの薬剤投与においても β -actin mRNAに対する相対発現量の有意な変化を認めなかった。

Tet-on HeLa細胞においては、imipramineを除く薬剤でcontrolに比べ、preGluR2 mRNAの β -actin mRNAに対する相対発現量比の低下が一部の濃度で認められた。ADAR2に関して、milnacipranの一部の濃度で β -actinに対するmRNA相対発現量比の有意な低下が認められた一方、imipramineでは一部の濃度で β -actinに対するmRNA発現量比の有意な上昇が認められた。ADAR2のpreGluR2に対するmRNA相対発現量比に関して、milnacipran以外の薬剤で、相対発現量比の有意な上昇が認められた。

考案

SH-SY5Y細胞ではSSRI及び三環系抗うつ薬の一部、Tet-on HeLa細胞ではSSRIとSNRIの一部及び三環系抗うつ薬のすべての薬剤投与により、GluR2 Q/R部位の編集率の有意な上昇を認めた。同部位のRNA編集率の増加は、ADAR2活性の上昇によってもたらされると考えられる。ADAR2活性はADAR2 mRNAのGluR2 mRNAに対する発現レベルにより規定されることが明らかにされているので、ADAR2の発現レベル、GluR2 mRNA及びpreGluR2 mRNAの発現レベルについて検討した。ADAR2活性上昇の機序に基質であるGluR2あるいはpreGluR2の発現量が関与しているかを明らかにするために、ADAR2/GluR2あるいはADAR2/preGluR2の比を測定した。SH-SY5Y細胞ではGluR2 Q/R部位の編集率を上昇させたfluvoxamine、fluoxetine、amitriptylineのうち、ADAR2/GluR2を上昇させるものはなかった。Tet-on HeLa細胞ではGluR2 Q/R部位の編集率を上昇させた薬剤のうち、fluvoxamine、paroxetine、amitriptyline、desipramine、imipramineで、すべての濃度ではないもののADAR2/preGluR2のmRNA発現比の有意な上昇を認め、このうちparoxetine及びamitriptylineでは濃度依存性の傾向を示した。Paroxetineとamitriptylineでは、そのGluR2編集率上昇作用は主に基質に対する酵素の発現量比の上昇が関与していると思われる。その他の薬剤のGluR2編集率上昇作用は基質に対する酵素の相対的発現量比のみでは説明できず、他の要素の関与が考えられた。治療薬としての応用のためには低濃度で編集率を上昇させることが理想的であり、その意味ではparoxetineが最も有望な薬剤と考えられた。

結論

SH-SY5Y細胞とTet-on HeLa細胞を用い、SSRI・SNRI・三環系抗うつ薬によるGluR2 Q/R部位のRNA編集率の変化についてスクリーニングした。Fluvoxamine、fluoxetine、milnacipran、amitriptyline、desipramine、imipramineにGluR2 Q/R部位のRNA編集率の上昇作用を認めた。その機序に不明な点は残されているが、ALSの治療薬として臨床応用の可能性が示唆された。

引 用 文 献

1. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S.
RNA editing and death of motor neurons.
Nature. 2004 Feb; 427(6977): 801.
2. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Kanazawa I, Kwak S.
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. 2003 Jul; 18(1): 23-33.
3. Barbon A, Popoli M, La Via L, Moraschi S, Vallini I, Tardito D, Tiraboschi E, Musazzi L, Giambelli R, Gennarelli M, Racagni G, Barlati S.
Regulation of editing and expression of glutamate α -amino-propionic acid (AMPA)/kainate receptors by antidepressant drugs.
Biol Psychiatry. 2006 Apr; 59(8): 713-20.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	澤田 潤
<p>審査委員長 松原和夫 ㊞</p> <p>審査委員 布村明彦 ㊞</p> <p>審査委員 長谷部直幸 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>抗うつ薬のグルタミン酸受容体サブユニット GluR2 の RNA 編集率に与える影響に関する研究 一筋萎縮性側索硬化症の治療薬としての可能性について一</p>			
<p>孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の脊髄運動ニューロンでは、グルタミン酸受容体 (GluR) のうち AMPA 受容体のサブユニットである GluR2 のグルタミン (Q) /アルギニン (R) 部位の RNA 編集率が特異的に低下している。AMPA 受容体の 4 つの構成サブユニットに少なくとも 1 つの編集型 GluR2 が存在しなければ、細胞内への Ca²⁺ 流入が上昇し細胞死に至る。即ち、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の低下が ALS の病態と深く関与している。GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は主に、ADAR2 によって行なわれ、ADAR2 活性を上昇させる薬剤は ALS における運動ニューロン死を阻止しうる可能性がある。本研究では、GluR2 Q/R 部位の編集率測定系を確立し、ALS 治療薬となりうる薬剤を探索することを目的とした。</p> <p>実験手法として、SH-SY5Y 細胞と Tet-on HeLa 細胞の 2 種類の培養細胞を使用した。HeLa 細胞には、GluR2 Q/R 部位のみを含む preGluR2 を導入し、同部位の RNA 編集率を低下させた。薬剤として、近年、GluR サブユニットの遺伝子発現量及び RNA 編集率を変化させることが報告されている抗うつ薬 (8 種類) を用いた。培養細胞から RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作製した。Nested PCR 法を用いて GluR2 Q/R 部位を含む領域を増幅させ</p>			

た後、制限酵素による各々の切断断片の濃度比から同部位の RNA 編集率を算出した。抗うつ薬の ADAR2 酵素活性への影響は、Real-Time PCR 法を用いて、基質に対する酵素の相対発現量比として測定した。

その結果、SH-SY5Y 細胞では、fluvoxamine、fluoxetine、amitriptyline により、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の上昇が観察され、ADAR2 mRNA 相対発現量の上昇を認めたものはなかった。HeLa 細胞では、paroxetine、fluvoxamine、milnacipran、amitriptyline、desipramine、imipramine により、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の上昇を認めた。この内、milnacipran 以外の薬剤で、ADAR2 mRNA の相対発現量の上昇が観察され、paroxetine と amitriptyline では濃度依存性の上昇を示した。従って、治療薬としての可能性は、paroxetine が最も有望と考えられた。

本研究の成果は、ALS の治療における抗うつ薬の有効性を示唆し、有効な治療薬に乏しい本疾患の治療の進展に大きく貢献し得ると考えられる有意義な知見であり、優れた研究成果といえる。なお、各審査委員より、本論文ならびに関連分野に関する試問の結果からも適切な解答が得られた。よって、審査委員会は、本論文が学位論文に十分値するものと判定した。