

---

筋萎縮性側索硬化症における選択的運動神経  
細胞死の病態解明に関する研究

---

課題番号 17590855

平成 17 年度一平成 18 年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 19 年 3 月

研究代表者 相澤 仁志  
旭川医科大学 医学部 講師

## <はしがき>

筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis、以下 ALS)は運動神経細胞が選択的に変性脱落し、全身の筋萎縮と脱力を来し、最終的には呼吸筋麻痺に陥る致死性の進行性神経変性疾患である。ALSは孤発性が多く、わずかに5-10%が遺伝性である。1870年代にJean-Martin Charcotにより疾患概念が提唱されて以来、孤発性ALSの病態は不明であった。最近、孤発性ALSにおいて脊髄の下位運動神経細胞の選択的変性にグルタミン酸受容体サブユニットGluR2 Q/R siteの編集率低下が関与していることが明らかにされ、ALSにおける運動神経細胞死にようやく納得のいく説明が可能となった。

グルタミン酸受容体サブタイプは、イオンチャネル型と代謝調節型に分けられ、イオンチャネル型はさらにNMDA受容体、カイニン酸受容体、AMPA受容体に分けられる。この中で速いシナプス伝達に関わるAMPA受容体は、脊髄運動神経細胞の遅発性興奮性細胞死に関与していると考えられている。その分子メカニズムとして、ALS脊髄運動神経細胞では、AMPA受容体チャネルのCa<sup>2+</sup>透過性を亢進させる分子変化が疾患特異的、細胞選択的に起こっていることがあきらかになった。

本研究ではAMPA受容体チャネルのCa<sup>2+</sup>透過性を規定する受容体サブユニットGluR2 Q/R siteの編集を司る酵素ADAR2をターゲットとして、ALSの病態の解明と治療への応用に関する新たな知見を得た。

## 研究組織

研究代表者：相澤 仁志（旭川医科大学医学部 講師）

研究協力者：澤田 潤（旭川医科大学医学部 大学院生）

研究協力者：油川陽子（旭川医科大学医学部 大学院生）

## 交付決定額（配分表）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	1,800,000	0	1,800,000
平成18年度	1,700,000	0	1,700,000
総計	3,500,000	0	3,500,000

## 研究発表

### (1) 学会誌等

Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K. Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 112; 597-603, 2006.

Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K. Immunoreactivities of p62, an ubiquitin-binding protein, in the spinal anterior horn cells of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 249:13-18, 2006.

Kobayashi H, Ngato T, Sato K, Aoki N, Kimura S, Tanaka Y, Aizawa H, Tateno M, Celis E. In vitro peptide immunization of target tax protein human T-cell leukemia virus type 1-specific CD4+ helper T lymphocytes. *Clin Cancer Res*. 12(12):3814-22, 2006.

Aizawa H, Aburakawa Y, Suzuki Y, Enomoto H, Makita Y, Kikuchi K, Kimura T, Yahara O. Treatment of Asian restless legs syndrome patients with cabergoline. -An open clinical preliminary trial-, *Intern Med*, 45:453-5, 2006.

Aizawa H, Makita Y, Sumitomo K, Aburakawa Y, Katayama T, Nakatani-Enomoto S, Suzuki Y, Fujiwara K, Enomoto H, Kuroda K, Kimura T, Yahara O, Koyama S, Maruyama J, Nakamura M, Hasebe N, Kikuchi K. Edaravone diminishes free radicals from circulating neutrophils in patients with ischemic brain attack. *Intern Med* 45:1-4, 2006.

相澤仁志、榎本 雪。帯状疱疹痛に対するガバペンチンの使用。神経内科、66 : 210、2007.

牧田圭弘、相澤仁志。【アルコール関連神経筋障害】 ペラグラ脳症。神経内科、62 : 439-444、2005.

相澤仁志、松橋浩伸、菊池健次郎。脳幹梗塞後に低酸素性虚血性脳症を合併した一例。The Circulation Frontier、9 : 55-57、2005.

相澤仁志、長谷部直幸、菊池健次郎。脳卒中と酸化ストレス。日循予防誌、40 : 50-54、2005.  
(総説)

### (2) 口頭発表

Osamu Yahara, , Yoshihiro Makita, Takashi Kimura, Kenji Kuroda, Hiroyuki Enomoto, Kazuhito Fujiwara, Tsukasa Saito, Yoko Aburakawa, Jun Sawada, Setsu Nakatani-Enomoto, Takayuki

Katayama, Hitoshi Aizawa. Diaphragm movement in myotonic dystrophy (MD1). 18<sup>th</sup> World Congress of Neurology, 5-11 Nov. 2005, Sydney, Australia.

Yoshihiro Makita, Hitoshi Aizawa, Setsu Nakatani-Enomoto, Takashi Kimura, Osamu Yahara. Serum oxidative and anti-oxidative agents associated with Parkinson disease: Electron spin resonance (ESR) study. 18<sup>th</sup> World Congress of Neurology, 5-11 Nov. 2005, Sydney, Australia.

Hitoshi Aizawa, Yoshihiro Makita, Jun Sawada, Yoko Aburakawa, Setsu Nakatani-Enomoto, Takayuki Katayama, Takashi Kimura, Osamu Yahara, Kenjiro Kikuchi, Tasaki, Kazuo Matsubara. L-DOPA diminishes free radicals from circulating neutrophils in patients with Parkinson disease. 18<sup>th</sup> World Congress of Neurology, 5-11 Nov. 2005, Sydney, Australia.

相澤仁志、國本雅之、齋藤 司、田中達也。脳ドック検診者の背景と虚血性脳病変。第16回日本脳ドック学会総会、盛岡、2007年4月26-27日。

相澤仁志、齋藤 司、油川陽子、澤田 潤、牧田圭弘、菊池健次郎。微小脳出血の臨床的意義に関する検討。第32回日本脳卒中学会総会、福岡、2007年3月22-23日。

齋藤 司、相澤仁志、油川陽子、澤田 潤、牧田圭弘、菊池健次郎、齋藤仁十、安栄良悟、國本雅之、程塚 明。当院における脳卒中の診療実績とその検討。第32回日本脳卒中学会総会、福岡、2007年3月22-23日。

相澤仁志、油川陽子、箭原 修、菊池健次郎。カベルゴリンによる restless legs syndrome の治療の試み。第24回神経治療学会総会、横浜、2006年7月13-14日。

榎本(中谷)雪、相澤仁志、菊池健次郎。パーキンソン病の振戦に対するレボドパの内服効果の検討。第48回日本老年医学会学術集会、金沢、2006年6月7-9日

相澤仁志、澤田 潤、油川陽子、郭 伸、河原行郎、日出山拓人、伊藤杏子。孤発性筋萎縮性側索硬化症の病態。第33回日本脳科学会、旭川、2006年6月2-3日。

相澤仁志、木村 隆、箭原 修、菊池健次郎。筋強直性ジストロフィーの嗅球病変。日本神経病理学会総会、岡山、2006年5月24-26日。

澤田潤 相澤仁志 齋藤司 油川陽子 榎本(中谷)雪 菊池健次郎、木村隆 箭原修。Spinocerebellar ataxia type 1 の3剖検例。日本神経病理学会総会、岡山、2006年5月24-26日。

澤田 潤、相澤 仁志、油川陽子、榎本 雪、菊池 健次郎、郭 伸。培養細胞での薬物負荷によるグルタミン酸受容体遺伝子の編集率変化に関する検討。第47回日本神経学会総会、横浜、2006年5月

齋藤 司, 相澤 仁志, 榎本 雪, 油川陽子, 澤田 潤, 菊池 健次郎。急性期脳卒中患者の発症から受診までの時間に及ぼす要因の検討。第 47 回日本神経学会総会、横浜、2006 年 5 月

油川陽子、木村 隆、片山隆行、澤田 潤、榎本 雪、相澤仁志、箭原 修、菊池健次郎。パーキンソン病における心拍変動と MIBG 心筋シンチグラフィーの関連についての検討。第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月 25～27 日。

片山隆行、油川陽子、澤田 潤、榎本 雪、相澤仁志、藤原和彦、榎本博之、黒田健司、木村隆、箭原 修、菊池健次郎。筋強直性ジストロフィーでみられた鏡像運動に関する SPECT と fMRI を用いた検討。第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月 25～27 日。

伊藤 崇、相澤仁志、菊池健次郎、木村 隆。慢性期脳梗塞患者における白血球と血小板の接着に関する検討。第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月 25～27 日。

牧田圭弘、相澤仁志、橋本和季、木村 隆、榎本 雪、藤原和彦、油川陽子、片山隆行、榎本博之、澤田 潤、黒田健司、小山 聡、箭原 修、菊池健次郎。未治療パーキンソン病に対する塩酸セレギリンのヒドロキシラジカル消去能。第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月 25～27 日。

澤田 潤、相澤仁志、牧田圭弘、鈴木康博、油川陽子、片山隆行、榎本 雪、菊池健次郎、木村 隆、箭原 修、瀧川一彦、木山博資、郭 伸。初代培養脊髄運動ニューロンにおける興奮性アミノ酸毒性の検討。第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月 25～27 日。

### (3) 出版物

相澤 仁志。中毒性疾患、臨床病態学 1、脳・神経系疾患（編集：楠 進）ニューヴェルヒロカワ（東京）、p211-221、2006 年

## 研究成果

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態に編集型 GluR2 の減少が関与していることが明らかにされている。GluR2 の Q/R 部位の RNA 編集は主に adenosine deaminases acting on RNA (ADAR2) によって行われる。ヒト ADAR2 遺伝子には 4 つの alternative splicing isoform が知られているが、その発現および機能に関しては未だ不明な点が多い。ADAR2 遺伝子導入は GluR2 サブユニットの編集率を促進し、AMPA 受容体を Ca 非透過型にして運動神経細胞に保護的に作用することが予測されるが、その検討は未だなされていない。以上の背景から、次の項目を研究目的とした。

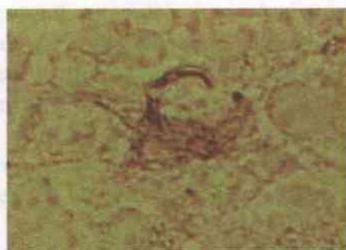
- ①ヒト ADAR2 遺伝子の発現および機能を解明するとともに、ALS における ADAR2 の疾患特異的変化の有無を明らかにする。
- ②GluR2 の Q/R 部位の RNA 編集率を上昇する薬剤のスクリーニング法を確立する。

### ADAR2 遺伝子の 4 つの alternative splicing isoform の過剰発現

ADAR2 遺伝子の C 末の alternative splicing isoform のうち 2L-2, 2L-3, 2S をプラスミドレベルで培養細胞 (COS 7) へ Lipofectamine を用いて過剰発現できることを確認 (下図)。

これらの alternative splicing isoform (2L-1, 2L-2, 2L-3, 2S) のうち 2L-2 は ADAR2 活性が高く、2L-3 はその活性が低い。2L-1 はその機能がまだ明らかにはなっていない。ADAR2 活性を上昇させることのできる、遺伝子の導入あるいは薬剤の投与は ALS の治療に応用可能と考えられる。

現在、より高率に発現させるためにヒト ADAR2 遺伝子の C 末の 4 種類の alternative splicing isoform (2L-1, 2L-2, 2L-3, 2S) をアデノウイルスベクターに組み込み中である。



## GluR2 の Q/R 部位の RNA 編集率を上昇する薬剤のスクリーニング法の確立

### 1. 培養細胞の GluR2 の Q/R 部位の RNA 編集率測定

培養細胞から RNeasy Mini Kit (for animal cells, QIAGEN code:74104)を用い RNA を抽出し、RT-PCR によって cDNA を作成。GluR2 Q/R site を含む 277bp を nested PCR によって増幅。Zymoclean Gel DNA recovery kit によって DNA を精製。PCR product を制限酵素 BbvI で処理し、泳動パターンにより編集率を算出した。

ラット脊髄運動ニューロンの初代培養、HeLa 細胞、COS7 細胞、SH-SY5Y 細胞のなかで SH-SY5Y 細胞の GluR2 の Q/R 部位の RNA 編集率が 33-66%であり、薬剤スクリーニングに使用可能と考えられた。そのため、以下の薬剤スクリーニングには SH-SY5Y 細胞を用いた。

### 2. SH-SY5Y 細胞を用いた薬剤スクリーニング

上記で確立した GluR2 の Q/R 部位の RNA 編集率測定法を用いて興奮性アミノ酸、抗うつ薬のスクリーニングを行った。

SH-SY5Y 細胞に薬剤を負荷し、24 時間後に細胞を回収し、GluR2 の Q/R サイト RNA 編集率を測定した。

スクリーニングした薬剤の中で、2 種の薬剤で (下図)、 $10\mu\text{M}$  以下のオーダーで Glu2 Q/R サイトの RNA 編集率が有意に上昇した。これらの薬剤は ALS の神経細胞死に抑制的に働くと考えられ、ALS の特異的治療に応用できる可能性が示唆された。

