

24) 孤発性筋萎縮性側索硬化症における神経細胞死  
のメカニズムの解析と新規治療薬の探索

研究代表者 澤田 潤

【研究成果の概要】

【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、Ca<sup>2+</sup> 流入が上昇し、細胞死に至ることが知られている。従って、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へ深く関与していると考えられている。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 における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の発現への影響を検討し、ALS 治療薬となりうる薬剤のスクリーニングをすることを目的とした。

【研究方法】

スクリーニングに用いる培養細胞として、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 HeLa 細胞に導入し、人為的に同部位の RNA 編集率を 50% 程度に調節した Tet-on HeLa G2m 細胞を作成した。抗うつ剤は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) は 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 種を用いた。また、抗うつ薬以外にも降圧剤や抗生剤、免疫抑制剤などの複数の薬剤の投与も行った。各薬剤を 10  $\mu$ M 以下の濃度で 24 時間負荷した。

GluR2 RNA 編集率の測定に関して、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、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断片が出現することを利用して、その比を測定し、同部位の RNA 編集率を算出した。

mRNA 発現量の測定に関して、GluR2 編集率の有意な上昇を認めた薬剤に関して、Real-Time PCR 法によって、ADAR2 酵素活性を意味する基質に対する酵素の相対発現量比として、ADAR2/preGluR2 比を測定した。

[結果と考察]

1) GluR2 編集率変化

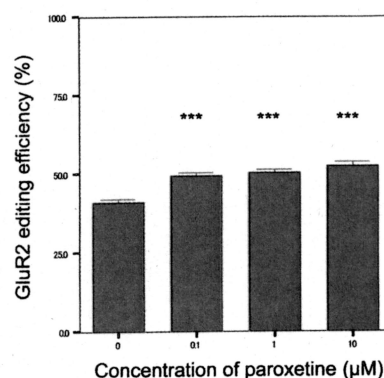
10 μM 以下の paroxetine、fluvoxamine、milnacipran、amitriptyline、desipramine、imipramine で control に対して有意な GluR2 編集率の上昇を認めた。また、降圧剤では Furosemide や Spironolactone、抗生剤では Suramine や Lomefloxacin、免疫抑制剤では Azathioprine の投与で GluR2 編集率の有意な上昇を認めた。(図 1. A; paroxetine B; amitriptyline C; Furosemide D; Spironolactone)

2) mRNA 発現量定量

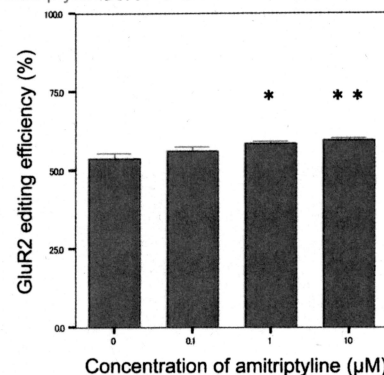
ADAR2 酵素活性を意味する ADAR2 の preGluR2 に対する mRNA 相対発現量比に関して、milnacipran 以外の薬剤で、すべての濃度ではないが、その相対発現量比の有意な上昇が認められた (図 2. A; paroxetine B; amitriptyline)。

Tet-on HeLa G2m 細胞の 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、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発現量比のみでは説明できないため、それ以外の要素が関与している可能性が考えられた。

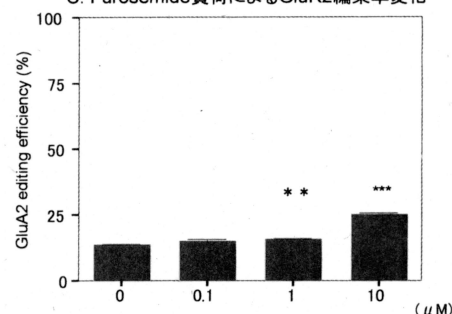
A. Paroxetine負荷によるGluR2 Q/R部位のRNA編集率変化



B. Amitriptyline負荷によるGluR2 Q/R部位のRNA編集率変化



C. Furosemide負荷によるGluR2編集率変化



D. Spironolactone負荷によるGluR2編集率の変化

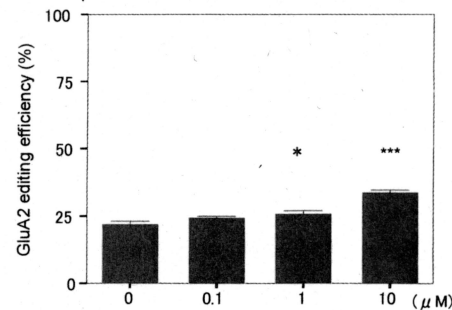
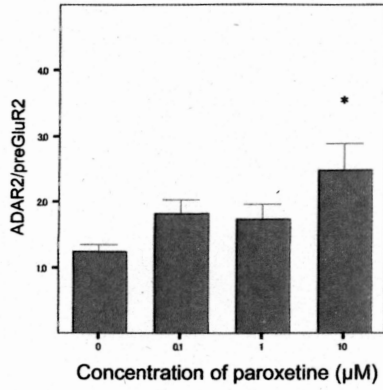


図 1

[まとめ]

Tet-on HeLa G2m 細胞を用い、複数の薬剤による 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、furosemide、

A. Paroxetine投与によるADAR2/preGluR2 mRNA相対発現量比の変化



B. Amitriptyline投与によるADAR2/preGluR2 mRNA相対発現量比の変化

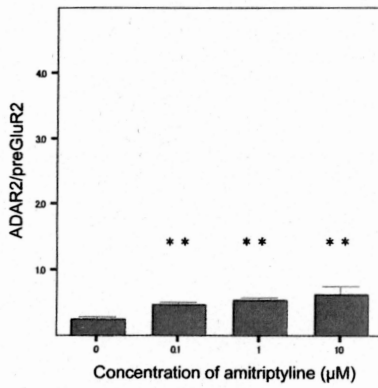


図 2

spironolactone、suramine、lomefloxacin、azathioprine に GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の上昇作用を認めた。その機序については不明な点はあるが、ALS の治療薬としての臨床応用の可能性が考えられた。