

論文の内容の要旨

論文題目 ALSラットモデルにおける脊髄運動ニューロン特異性の検討

指導教官 郭 伸 助教授
東京大学大学院医学部研究科
平成12年4月入学
医学博士課程
脳神経医学専攻
氏名 孫 慧

序論

筋萎縮性側索硬化症は、上位および下位運動ニューロンが進行性かつ選択的に障害される神経変性疾患である。現在のところ、根本的な原因、有効な治療法は解明されていない。ALSの5-10%程度は家族性ALSである。その中約20%はSOD1遺伝子を原因遺伝子として同定された。最近、ALS2、ALS4およびALS8の原因遺伝子も同定された。孤発性ALSの病因は依然として不明であるが、AMPA受容体を介する遅発性興奮性神経細胞死が最も有力な病因仮説である。

孤発性ALSではGluR2 mRNAの量的変化は確認できなかったため、むしろ、質的異常(Q/R部位でのRNA編集異常)が密接に病因と関連していると考えている。しかし、孤発性ALSの適切な動物モデルは得られていない。カイニン酸が脊髄前角運動ニューロンに傷害を与えることは培養細胞系および短時間投与のin vivo実験系で示されたが、脊髄くも膜下腔へのカイニン酸の慢性持続投与による遅発性神経毒性は検討されていなかった。

実験目的

1. 我々は興奮性神経細胞死仮説に基づくカイニン酸髄注ラットを開発し、ALSモデルとしての妥当性を行動変化、神経病理学変化およびAMPA受容体分子変化から検討し、孤発性ALSとの異同を考察する。
2. 正常ヒト脊髄運動ニューロンにおけるAMPA受容体サブユニット発現プロファイルの特異性が正常ラットでもみられるかどうかを明らかにするために、定量RT-PCRによりAMPA受容体各サブユニットmRNA発現量およびGluR2 mRNAの発現比率を、脳脊髄組織、単一ニューロンで比較検討する。
3. 家族性ALSと孤発性ALSの病因異同を調べるために、家族性ALSのモデルである変異ヒトSOD1トランスジェニックラットを用いて、脊髄ニューロンにおけるAMPA受容体各サブユニット発現量および単一運動ニューロンのGluR2 Q/R部位の編集率を定量し、孤発性ALSとの差異を比較検討する。

実験材料と方法

1. カイニン酸髄注によるALSモデル動物の作成

Nakamura&Kwakの方法に従い、雄WistarとFischerラット脊髄くも膜下腔に微小浸透圧ポンプ(ALZET Model 2004)を用いて、3 mMカイニン酸を2-8週間持続的に投与しモデルラットを作成した。対照としては人工髄液を同期間投与し

た。細胞死のメカニズムを検討するために、雄 Fischer ラットにカイニン酸投与と同時に、AMPA/KA 受容体アンタゴニスト NBQX (3 mM カイニン酸 + 3 mM NBQX)、NMDA 受容体アンタゴニスト APV (3 mM カイニン酸 + 3 mM APV) および AMPA 受容体脱感作阻害剤 cyclothiazide (1.5 mM カイニン酸 + 1.5 mM CTZ) を 4 週間同時投与した。CTZ (1.5 mM CTZ) の同期間の単独投与も行った。

運動機能変化は rotarod (16 rpm, 420 s) スコアにより週ごと評価し、同時に痛覚刺激に対する逃避反応および膀胱直腸障害の有無を判定した。神経病理学的に、灌流固定したラットの腰髄組織を用いて凍結切片を作製した後、光学顕微鏡下に脊髄前角運動ニューロンの形態学的変化を観察した。また、ラットの腰髄組織より 20 μ m 厚の 30 枚連続凍結切片を作成し、切片ごと核小体を有する脊髄前角運動ニューロン数を測定した。

2. AMPA 受容体の分子変化

正常ラット、髄注モデルラットおよび発症前後変異ヒト SOD1 トランスジェニックラット(SOD1^{G93A} と SOD1^{H46R})を用いて、脳脊髄組織より小脳、大脳皮質、大脳白質、脊髄前角、脊髄後角、脊髄白質より組織 (≤ 10 mg) を切り出し、または Laser microdissector を用いて、脊髄運動ニューロン (30 個単位)、小脳プルキンエ細胞 (60 個単位)、脊髄膠様質ニューロンの一部、小脳顆粒細胞層を切り出した。その後各サンプルより total RNA を抽出し、逆転写した。LightCycler System を用いて、AMPA 受容体サブユニット GluR1-GluR4 mRNA に対し、定量 RT-PCR を行ない、 β -actin で標準化した。またカイニン酸髄注ラットおよび変異ヒト SOD1 トランスジェニックラット単一脊髄運動ニューロンを用いて、GluR2 Q/R 部位を含む PCR 産物を制限酵素 Bbv1 で処理し、RNA 編集率を算出した。

結果

1. カイニン酸髄注ラットによる ALS モデル動物

- 1) このモデルラットは、Wistar と Fischer ラットともカイニン酸投与時間とともに 2 週以降に rotarod スコアが有意に短縮した。対照群では rotarod スコアが変化しなかった。痛覚刺激に対する逃避反射は保たれ、膀胱直腸障害も認められなかった。神経病理学的に、カイニン酸を 8 週間投与した Wistar ラット (KA-W8) と 4 週間投与した Fischer ラット (KA-F4) の脊髄前角にある一部の大型神経細胞の細胞質ニッスル顆粒の消失、核の偏在、空泡の出現、神経細胞を取り巻くグリア細胞の増勢など変性像が多数みられた。脊髄後角には形態学的変化が認められなかった。脊髄前角運動ニューロンの定量では、対照群に比べ、KA-F4 と KA-W8 投与群では有意な減少がみられたが、KA-F2 と KA-W4 投与群では、有意差が認められなかった。
- 2) カイニン酸髄注ラットの時間依存性 rotarod スコア低下は NBQX の同時投与により 3 週以降有意に改善されたが、APV の同時投与によっては影響を受けなかった。また、カイニン酸と CTZ の同時投与群では、rotarod スコアを有意に増悪させ、少量のカイニン酸でも、カイニン酸投与群と同程度の rotarod スコアの低下がみられた。CTZ 単独投与群では、rotarod スコアの変化が認められなかった。各髄注ラットの脊髄前角運動ニューロン定量では、KA-F4 投与群の脊髄運動ニューロン数の激減は NBQX の同時投与により有意に軽減し

た。KA/CTZ の同時投与群では、対照群に比較し脊髄運動ニューロン数が 4 週後有意に減少したが、カイニン酸投与群に比べ、わずかな脊髄運動ニューロン数の低下がみられ、有意差は認められなかった。CTZ 単独投与群の脊髄運動ニューロン数は対照群との有意差が認められなかった。形態学的に、KA/CTZ-F4 投与群では KA-F4 投与群と異なり、脊髄前角にある大型神経細胞に空泡の出現など変性像が最も注目された。脊髄後角には神経変性が認められなかった。

2. ALSモデル動物におけるAMPA受容体の分子変化

- 1) 正常ラット脳脊髄組織における総 AMPA 受容体サブユニット mRNA 発現量は、脳脊髄の白質より脊髄前角を除く灰白質の方が有意に多かった。脊髄前角における GluR2 mRNA 発現量は、脳脊髄の灰白質中最も少なかった。脊髄前角における GluR2 mRNA 発現比率は、他の脳脊髄組織と比較し、有意に低かった。GluR2 mRNA 含量は他のサブユニットと比較し、ラット脳脊髄各部位とも最も多かった。
次に、正常ラット脊髄運動ニューロンにおける総 AMPA 受容体サブユニット mRNA 発現量、GluR2 mRNA 発現量・発現比率は、脊髄後角ニューロン、小脳プルキンエ細胞、小脳顆粒細胞に比べ、有意に低かった。脊髄運動ニューロンで GluR2 と GluR3 mRNA 発現はほぼ同量であったが、脊髄後角ニューロン、小脳プルキンエ細胞、小脳顆粒細胞では、GluR2 mRNA 含量が圧倒的に多かった。
- 2) カイニン酸投与群脊髄運動ニューロンでは、総 AMPA 受容体サブユニット mRNA 発現量、GluR3 mRNA 発現量が、Wistar と Fischer ラットともそれぞれの対照群に比べ有意に増加した。他の AMPA 受容体サブユニット mRNA の発現量は、対照群との有意差を認めなかった。GluR2 mRNA 発現比率は、それぞれの対照群に比較し、カイニン酸投与群が有意に低下した。
脊髄後角ニューロンと脊髄白質における AMPA 受容体各サブユニット mRNA 発現量は、対照群との間に有意差を認めなかった。
- 3) 変異ヒト SOD1 トランスジェニックラット脊髄運動ニューロンと脊髄後角ニューロンとも、発症の有無を問わず、総 AMPA 受容体サブユニット mRNA 発現量と GluR2 mRNA 発現量・発現比率は、それぞれの同腹対照との有意差が認められなかった。
- 4) GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は選択的な脊髄運動ニューロン変性・脱落を確認した KA-W8 投与群とその対照群の単一運動ニューロンで検討し、例外なく全て 100%であった。
また、発症後変異ヒト SOD1 トランスジェニックラットおよびそれぞれの同腹対照の全ての運動ニューロンにおいて、変異ヒト SOD1 遺伝子、発症の有無に関係なく、GluR2 RNA 編集率は 100%であった。

考察

1. カイニン酸髄注ラットによる ALS モデル動物の妥当性

カイニン酸髄注ラットは、運動機能選択的な障害、脊髄運動ニューロン選択的な変性・脱落が生じ、ALS の病態を反映する疾患モデルと結論づけることができ、ALS の病態生理を研究する上に有用なツールになると考えられる。従来

のモデル動物では、変異ヒト SOD1 トランスジェニック動物を含め例外なく、このような運動機能と運動ニューロンの選択性・特異性が得られていなかった。

グルタミン酸受容体のアンタゴニストを用いた研究で、カイニン酸持続髄注によって引き起こされた選択的運動ニューロン変性は、AMPA/KA 受容体を介するものであることが明らかになった。また、CTZ を用いた結果から、脱感作時間変化のみでは細胞生存に大きな影響を与えないこと、カイニン酸毒性が脱感作をブロックされた AMPA 受容体を刺激したことにより増強したことが考えられる。カイニン酸持続髄注による選択的運動機能の低下と脊髄運動ニューロンの変性・脱落が AMPA 受容体を介したものと考えられる。

2. 正常ラットにおける AMPA 受容体サブユニット mRNA 発現プロファイル

今回正常成熟ラット脳脊髄単一神経細胞を、レーザーマイクロダイセクションシステムと定量 RT-PCR により検討し、AMPA 受容体サブユニット mRNA 発現プロファイルを初めて定量したものである。GluR2 mRNA 発現量は組織、細胞種を問わず、最も多いことが示された。また GluR2 mRNA 発現量・発現比率は脊髄運動ニューロンで最も低いことが分かった。このことは、脊髄運動ニューロンにおける Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体密度が比較的高いことを予測させ、従って AMPA 受容体を介した興奮性神経細胞死により脆弱であり、ALS における神経細胞死選択性に説明する一要素であると考えられる。

我々の結果と以前の定量報告との違いは神経細胞の成熟度によると考えられる。ラットの脊髄運動ニューロンにおける GluR2 mRNA が総 AMPA 受容体サブユニットに占める発現比率は相対的に最も高かったが、その程度はヒトと比較し、より低いことが相違点としてあげられる (39~63% vs 77.8 ± 2.0%)。

3. カイニン酸髄注ラットにおける AMPA 受容体の分子変化

この髄注ラットでは、脊髄運動ニューロンに選択的な GluR3 mRNA の上昇は AMPA 受容体密度の上昇につながり、二次的に GluR2 サブユニットを含む AMPA 受容体の割合を低下させ、すなわち、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の割合が上昇し、AMPA 受容体を介する Ca^{2+} 流入は更に増加することが予想され、これが運動ニューロンの機能を傷害する可能性があると考えられる。また、孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンに特異的に生じている GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率低下は選択的な運動ニューロンの変性・脱落が認められた KA-W8 投与群脊髄運動ニューロンですら生じていなかった。すなわち、カイニン酸髄注ラットの運動機能障害、選択的脊髄運動ニューロン変性は GluR2 RNA 編集低下を伴わず、孤発性 ALS と異なる興奮性神経細胞死経路を経て起こっていると考えられる。

4. 変異ヒト SOD1 トランスジェニックラットにおける AMPA 受容体の分子変化

家族性 ALS の動物モデルである変異ヒト SOD1 トランスジェニックラットにおいて、発症例でも AMPA 受容体サブユニット mRNA 発現プロファイル、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率のいずれにも同腹対照との間に差異が認められないことから、その神経細胞死のメカニズムは孤発性 ALS で見られた GluR2 mRNA 編集率低下によるものではないと考えられる。GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率低下がみられなかったことが判明した以上、変異ヒト SOD1 トランスジェニック動物は孤発性 ALS の動物モデルに当たらないと認識すべきである。