

## 審査の結果の要旨

氏名 孫 慧

孤発性 ALS は 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。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。本論文は脊髄くも膜下腔へカイニン酸持続投与により髄注モデルラットを開発し、孤発性 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た。また正常ラッ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を脳脊髄組織、単一ニューロンで比較検討した。最後に、家族性 ALS と孤発性 ALS の病因異同を家族性 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における AMPA 受容体の分子変化から比較検討した。下記の結果を得ている。

1. カイニン酸髄注ラットは、後肢の運動麻痺を生じ、後肢の運動機能低下が rotarod スコアにより評価された。痛覚刺激に対する逃避反射は保たれ、膀胱直腸障害を認められなかった。脊髄運動ニューロンに選択的変性を生ずることが確認され、脊髄前角細胞の脱落が定量的測定より明らかになった。この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る。
2. グルタミン酸受容体のアンタゴニストを用いた研究では、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、NMDA 受容体アンタゴニスト (APV) によって阻止されなかったが、AMPA/KA 受容体アンタゴニスト (NBQX) により神経細胞死が改善された。また、AMPA 受容体の脱感作阻害剤である CTZ の単独投与では全く神経細胞死への影響がなく、カイニン酸の同時投与では強い運動ニューロン死がみられた。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。
3. 正常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 の定量的発現プロファイルを初めて得た。正常ラット脳脊髄組織とニューロンにおける GluR2 mRNA 発現量は組織、細胞種を問わず、他のサブユニットと比較し、最も多いことが示された。また GluR2 mRNA 発現量・発現比率は脊髄前角と脊髄

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  $\text{Ca}^{2+}$ 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。

4. カイニン酸髄注ラットでは、脊髄運動ニューロンにおける GluR3 mRNA 発現量の上昇が示され、脊髄後角ニューロンには認められなかったことから、脊髄運動ニューロンに選択的な分子変化であると考えられる。カイニン酸持続髄注により脊髄運動ニューロンに選択的に生じている GluR3 mRNA の発現上昇は、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、 $\text{Ca}^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体の割合が上昇し、AMPA 受容体を介する  $\text{Ca}^{2+}$ 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・脱落が認められたカイニン酸 8 週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。

5. 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、AMPA 受容体サブユニット mRNA 発現プロファイルは、それぞれの同腹対照との有意差が認められなかった。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卵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。ALS1 における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。

以上、本論文は ALS の病因研究、治療法の開発にとり、必要な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・脱落を引き起こしたモデル動物を作製したものである。このような ALS の病態を反映する疾患モデルはこれまでになく、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、学位の授与に値するものと考えられる。