

審査の結果の要旨

氏名 日出山 拓人

本研究は孤発性筋萎縮性側索硬化症（以下ALS）における選択的神経細胞死のメカニズムを明らかにするため、興奮性神経細胞死仮説に基づき、孤発性ALS患者剖検脊髄前角組織におけるAMPA受容体サブユニットGluR2 Q/R部位のRNA編集異常の疾患特異性を様々な病型の孤発例および家族性ALSを含む運動ニューロン疾患との対比により単一運動ニューロンレベルで示した。さらに、この分子変化が同部位のRNA編集に特異的に関わるADAR2の活性低下によりもたらされることを患者組織におけるADAR2発現レベル及び各種基質のRNA編集率の検討から明らかにした。その上でこの分子変化が神経細胞死に直接関わることをADAR2のコンディショナルノックアウトマウスを作成することで証明したもので、下記の結果を得ている。

1. 前半では、ヒト剖検脳脊髄前角組織及びlaser microdissectorで切り出した単一脊髄運動ニューロンを用いて、正常対照（n=12）、孤発性ALS（29例（四肢型 18例（経過13年の臨床的SPMA 1例を含む）、球麻痺型 8例、ALS痴呆（ALS-D） 2例、basophilic inclusion bodyが出現する若年発症例 1例）、孤発性ALS以外の運動ニューロン病であるトリプレット病の球脊髄性筋萎縮症（以下SBMA）（n=3）と家族性ALS1ラットモデル（SOD1^{G93A}およびSOD1^{H46R}、各n=3）の運動ニューロンで、1) GluR2 Q/R 部位のRNA編集率、2) GluR2 Q/R部位以外の既知のADAR2基質であるGluR6 Q/R部位、kv1.1 I/V部位などの編集率、3) 孤発性ALSの前角においてADAR2 mRNA発現レベルとADAR2 基質の編集率の相関を検討した。

その結果、前角でGluR2 Q/R部位の編集低下が臨床病型に関わらず、孤発性ALSと診断された症例全例にみられること、SBMAと家族性ALS1ラットモデルの単一運動ニューロンの同部位の編集率は正常群同様に100%であった。故に疾患特異的な分子変化であり、運動ニューロン死に生ずる非特異的な分子変化である可能性が除外された。GluR2 Q/R 部位のRNA編集を特異的に触媒するADAR2 mRNAの発現量は、孤発性ALSの前角特異的に有意に低下し、GluR2 Q/R部位の編集率との間に相関がみられること、GluR6 Q/R部位の編集率の低下がみられたことから、孤発性ALS運動ニューロンではADAR2活性が低下していると考えられた。

以上の剖検組織の検討から孤発性ALS運動ニューロンに生じているGluR2 Q/R 部位のRNA編集率低下が疾患特異的であり、編集酵素ADAR2の活性低下によりもたらされた可能性が高いことを示した。

2. 後半では、前半の結果をふまえ、孤発性ALSは、ADAR2活性低下によりGluR2 Q/R部位のRNA編集が低下することで神経細胞死が生じる、という仮説（孤発性ALSのADAR2仮説）を立て、この仮説を検証するために運動ニューロン選択的なADAR2のコンディショナルノック

アウトマウスを作製し、ADAR2 活性低下が、孤発性ALS運動ニューロンに見られる GluR2 Q/R部位のRNA編集異常と緩徐進行性運動ニューロン死を引き起こすかどうか、を検討した。ADAR2活性基であるdeaminase domainを2個のLoxPで挟んだADAR2^{fllox} alleleをホモに持つ変異マウス (ADAR2^{fllox/fllox}) を作成し、運動ニューロン選択的に小胞性アセチルコリントランスポーターのプロモータによりCre recombinaseを異なった時期に発現する2系統の変異マウス (VChT-Cre.Fast と-Cre.Slow) との交配により、ADAR2^{fllox/fllox}/VChT-Cre.Fast (n=28) と-Cre.Slow (n=33) を作製した。

その結果、コンディショナルノックアウトマウスの運動ニューロンでCreによるADAR2^{fllox} allele の遺伝子組み替えが生じて、Creの発現に伴い活性基を欠如したADAR2^{fllox} の遺伝子産物を発現すると予想される。これをISH, PCR法にて確認した。これらのニューロンは約40%を占め、全てGluR2 Q/R部位の編集率が0%に低下しており、ADAR2タンパクが発現していないことを免疫組織化学で確認した。これらのノックアウトマウスは、5-8週齢以降に緩徐進行性に運動機能の低下を示し、生存期間もコントロール群に比べ有意に短縮し (median survival \pm SEM; 81.5 \pm 16.4 週 versus コントロール群 105.1 \pm 13.5 週; P=0.0262, Log-rank analysis), 緩徐進行性に2ヶ月齢以降、変性・脱落が約40%の運動ニューロンに生じた。

以上から、ADAR2活性の消失により、GluR2 Q/R部位のRNA編集が欠如し、緩徐進行性の運動ニューロン死を引き起こすことを初めて示した。緩徐進行性の経過は孤発性ALSの臨床経過に酷似する。

以上のように、剖検組織の検討から孤発性ALS運動ニューロンに生じているGluR2 Q/R部位のRNA編集率低下が疾患特異的であり、編集酵素ADAR2の活性低下によりもたらされた可能性が高いことを示した。ADAR2のコンディショナルノックアウトマウスを開発し、ADAR2欠損が緩徐進行性の運動ニューロン死の直接原因になることを示した。以上から孤発性ALS運動ニューロンに見られるGluR2 Q/R 部位のRNA編集異常は、ADAR2活性低下によること、緩徐進行性の神経細胞死の直接原因であることが示され、「孤発性ALSのADAR2仮説」に矛盾しない結果を得た。これらの結果は、患者剖検組織を用いて孤発性ALSに疾患特異的な分子変化を見出し、この知見を基にモデル動物を開発することで病因との関連を明らかにしたもので、極めて独創性が高く、得られた知見の質も高いものであり、孤発性ALSの病態解明、治療法開発に向けて重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。